

ALCIDES GUIMARÃES
CIRURGIÃO DENTISTA

Participação do Parotin sobre o Metabolismo Lipídico de
Ratos Normais e Diabéticos (ESTUDO "IN VITRO" E "IN VIVO")

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para o Concurso de Habilitação à
Docência Livre na Área de Fisiologia e Biofísica
do Departamento de Ciências Fisiológicas.

PIRACICABA - SP

1982

1982-08-10
BIBLIOTECA CENTRAL

*A minha esposa Marisa
e a meus filhos Ana Maria
Luis Alvaro
Luis Carlos
dedico este trabalho*

A memória de meu pai e, à minha mãe,
responsáveis pela minha forma-
ção, a mais sincera gratidão.

A minha esposa Marília e filhos: André,
Guilherme e Marcelo, dedico este
trabalho.

AGRADECEMOS:

Ao Professor Doutor ANTONIO CARLOS NEDER, Coordenador Geral das Faculdades, da Universidade Estadual de Campinas, pela compreensão e estímulo que dedica aos docentes desta Faculdade;

Ao Professor Doutor LUIZ VALDRIGHI, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP e ao Professor Doutor SIMONIDES CONSANI, Diretor-Associado, pela retidão de caráter, honestidade e humildade com que distinguem a todos, sem exceção;

Ao Professor Doutor DECIO TEIXEIRA, responsável pelas áreas de Fisiologia e Biofísica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP, companheiro de todas as horas, pela sabedoria e constancia no ensinar e pelo incentivo e apoio a nós distinguido ao longo desses anos todos;

Ao Professor Doutor JAIME APARECIDO CURY, da área de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP, exemplo de dedicação à pesquisa, pelas sugestões e colaboração na execução das técnicas bioquímicas, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho;

Ao Professor Doutor MARIO ROBERTO VIZIOLI, Professor-Adjunto da área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela revisão deste trabalho;

Ao Doutor MASAAKY YAMAMOTO, Ph.D. Manager, Pharmaceutical and Manufacturing Technology of the Teikoku Hormone MFG. Co., Ltda., pelo fornecimento do Parotin;

As Srtas. ELIETE LUCIANO e MÁRCIA ORTIZ MONTEIRO, Pós-Graduandos da área de Fisiologia da FOP, UNICAMP, pela colaboração na revisão bibliográfica e pela colaboração na parte experimental;

Aos Srs. CARLOS ALBERTO APARECIDO FELICIANO e ULYSSES DE OLIVEIRA MARTINS, técnicos do laboratório de Fisiologia e Biofísica da FOP-UNICAMP, pelo valioso auxílio durante a fase experimental;

A Srta. MARIA APARECIDA NALIN, pela dedicação e presteza nos serviços datilográficos;

A Srta. MARIA DE FÁTIMA F.S. DANTAS, pela confecção dos gráficos que ilustram esse trabalho;

Ao Sr. SEBASTIÃO RODRIGUES DE BARROS, pelos serviços de impressão e encadernação;

A todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a execução deste trabalho.

C O N T E U D O

CAPÍTULO I	pag.
1. INTRODUÇÃO	9
CAPÍTULO II	
2. REVISTA DA LITERATURA	13
2.1. Participação das glândulas salivares e Parotin sobre o metabolismo de proteí- nas	13
2.2. Participação das glândulas salivares e Parotin sobre o metabolismo proteico	17
2.3. Participação das glândulas salivares e Parotin sobre o metabolismo lipídico	19
2.4. Considerações gerais sobre o metaboli- s- mo lipídico	19
2.5. Proposição	28
CAPÍTULO III	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Determinação do glicérol - Estudo "In Vitro"	
3.1.1. Sequência do Experimento "In Vitro"	30
3.1.2. Produção de ratos diabéticos	31
3.1.3. Sistemas experimentais empregados	32
3.2. Determinação de ácidos graxos livres - Es- tudo "In Vivo".	
3.2.1. Sequência do Estudo "In Vivo"	35
3.2.2. Determinação dos ácidos graxos li- vres	36

	pag.
CAPÍTULO IV	
4. RESULTADOS	38
4.1. Estudo "In Vitro"	38
4.2. Estudo "In Vivo"	47
CAPÍTULO V	
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Estudo "In Vitro"	59
5.2. Estudo "In Vivo"	64
CAPÍTULO VI	
6. CONCLUSÕES	70
CAPÍTULO VII	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CAPÍTULO VIII	
8. RESUMO	89
CAPÍTULO IX	
9. APÊNDICE	92

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As glândulas salivares tem sido estudadas por numerosos pesquisadores, procurando-se estabelecer suas relações com atividades de secreção interna e sua interação com outras glândulas.

Apesar de algumas pesquisas terem revelado possíveis funções endócrinas das glândulas salivares, relacionadas principalmente com o metabolismo de carboidratos (UTIMURA, 1927; SEELIG, 1928; HIKI et alii, 1929, 1930, 1932 e 1934), somente a partir de 1934, com OGATA, que propôs a "Teoria Endócrina das Glândulas Salivares", foi que a relação glândulas salivares-metabolismo, começou a ser melhor observada.

Assim sendo, OGATA (1944), e posteriormente ITO (1954), isolaram e cristalizaram das glândulas parótidas de boi, uma substância biologicamente ativa, de natureza proteica, que denominaram de Parotin.

As revelações destes pesquisadores marcaram o início de uma investigação mais profunda, a fim de definir as funções endócrinas das glândulas salivares, chamando a atenção de numerosos estudiosos, procurando inter-relacionar as funções destas glândulas com as demais do sistema endócrino.

Subsequentemente, TAKIZAWA (1954), OGATA (1955) e ITO (1960), demonstraram que as glândulas parótidas seriam a principal fonte do que eles denominaram "Hormônio Salivar (Parotin)" sendo que as glândulas sub-mandibulares também secretariam uma pequena fração desta substância, o mesmo ocorrendo com as glândulas sub-linguais.

A participação das glândulas salivares em atividades endócrinas é demonstrada também, pela existência de outras substâncias secretadas por essas glândulas conforme observado por COHEN (1960) que isolou das glândulas sub-mandibulares de camundongos, um fator de crescimento nervoso (NGF) que estimula o crescimento e a diferenciação das células nervosas sensitivas e simpáticas. Esse mesmo autor, em 1962, isolou das glândulas sub-mandibulares de ratos, um polipeptídeo, fator de crescimento epidermal (EGF), que acelera a erupção dos incisivos de ratos recém-nascidos. Tais observações foram confirmadas por outros pesquisadores (ANGELETTI, LEVI-MONTALCIN & CALLISSANO, 1968).

Dentre outros princípios ativos isolados das glândulas salivares, pode-se citar:- fator de crescimento das células cardíacas (BAST & MILS, 1963), fator de crescimento de células do tubo neural (ADLER & NARBAITZ, 1965), fator de estimulação do crescimento de células mesenquimais e que causa diferenciação do tecido muscular e cartilaginoso (ATTARDI, SCHLESINGER & SCHLESINGER, 1967), fator que promove linfopenia e atrofia do tecido linfóide (TAKEDA et alii, 1967), fator letal das glândulas sub-mandibulares, liberado quando se transplantam essas glândulas para um hospedeiro, e que é diretamente relacionado com o sexo masculino (HOSHINO & LIN, 1968 e 1969), fator hemorrágico, que promove hematoma local e intensa hemorragia sistêmica (HOSHINO & LIN, 1969), fator hiperglicemiante das glândulas sub-mandibulares, denominado "glucagon salivar" (LAWRENCE et alii, 1977) e finalmente, em 1979, ARRUDA VEIGA, que isolou um peptídeo do extrato de glândulas sub-mandibulares de camundongos, que provoca além de poliúria, albuminúria e uma série de alterações nas estruturas renais.

Todas estas descobertas vieram fortalecer a hipótese formulada pelo grupo de OGATA a respeito das funções endócrinas das glândulas salivares.

As inter-relações entre glândulas salivares e metabolismo em geral também tem sido fruto de inúmeras pesquisas, no sentido de se procurar elucidar as reais funções dessas glândulas, o que vem justificar o interesse do Departamento na sequência de sua linha de pesquisa.

CAPÍTULO II - REVISTA DA LITERATURA

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1. Participação das glândulas salivares e Parotín sobre o metabolismo de carboidratos

Os efeitos das glândulas salivares sobre o metabolismo dos carboidratos foram sugeridos por FERRANINI (1911), que relatou um caso de "Diabetes salivar". Neste caso, o paciente apresentava um fluxo de saliva contendo dextrose, sendo que essa glicossialorréia alternava-se com a glicosúria, substituindo-a.

Também FARRONI (1911) observou que o extrato de glândulas salivares de bovinos exercia efeitos hipoglicemiantes em coelhos, reforçando as sugestões de FERRANINI.

Esses achados, porém, não foram confirmados por GOLJANITZKI (1924) quando revelou que a remoção das glândulas parótidas e sub-mandibulares de coelhos induziu à formação de edema, glicosuria e morte. O mesmo autor verificou também que a ligação dos ductos das parótidas não trazia resultados benéficos em pacientes diabéticos.

Em contraposição, UTIMURA (1927), SEELIG (1928) e De TAKÁTS (1930) descreveram uma série de casos, onde os sintomas clínicos do diabêtes foram melhorados, após a ligação dos ductos das glândulas parótidas. Esses dados foram confirmados por ZIMMERMAN (1932), que demonstrou, após a determinação da curva de tolerância à glicose, em cães, antes e após a ligadura dos ductos das parótidas, que essas glândulas exerciam alguma influência, até o momento não conhecida, sobre o controle do metabolismo de carboidratos.

Essa afirmativa veio ao encontro de sugestões de vários autores (HIKI et alii, 1930, 1932, 1934 ; OGATA, 1934) que

revelaram existir uma eventual relação entre a secreção interna das glândulas salivares e o metabolismo de carboidratos.

Todavia, em 1933, ROSENFELD descreveu que a hipoglicemia subsequente à ligadura dos ductos das parótidas era induzida mais pela absorção da amilase, do que em decorrência de uma secreção interna das glândulas salivares análoga à insulina.

Por outro lado, FERRETI (1936) e DOBREFF (1936) afirmaram que a hipertrofia das glândulas parótidas de diabéticos poderia ser um mecanismo compensador, isto é, as parótidas assumiriam as funções do pâncreas na elaboração da insulina.

BIRNKRANT (1941) e BIRNKRANT & SHAPIRO (1942) verificaram que a parotidectomia bilateral promovia hipoglicemia em ratos. Posteriormente, analisando a influência do extrato de parótidas na glicemia e nas estruturas do pâncreas do mesmo animal, observaram que a administração prolongada deste extrato levava, invariavelmente, a uma degeneração das ilhotas de Langerhans e a uma significativa hiperglicemia.

Estes resultados não foram confirmados por GAULT (1954) o qual relatou que a ausência das glândulas parótidas em ratos e camundongos não revelou alteração do nível glicêmico. Mas, em 1957, PARHOM, BABES & PETREA afirmaram que a administração de um extrato parotidiano, em coelhos, provocou um prolongado estado hiperglicêmico. Com o mesmo extrato, estes autores obtiveram um aumento estável do nível glicêmico em enfermos com hiperinsulinismo.

FLEMING (1959) observou que a administração intramuscular de Parotin em camundongos normais, numa concentração de 0,30 mg cada 3 dias, num total de 10 injeções, durante um período de 24 a 30 dias, promoveu alterações tanto no pâncreas exócrino, quanto no endócrino. Tais modificações foram mais evi

dentes nas ilhotas de Langerhans, que se mostraram hiperplásicas e hipertróficas. Quanto ao nível glicêmico, notou uma acentuada diminuição.

GODLOWSKY & CALANDRA (1960) observaram, após a ablação bilateral das glândulas sub-mandibulares e sub-linguais de cães, um significativo aumento da sensibilidade à insulina e uma diminuição da tolerância à glicose, com aumento de sua utilização. Os autores concluíram que as glândulas sub-mandibulares e sub-linguais produzem um fator inibidor da insulina.

Em 1960, ITO, através de uma extensa revisão, confirmou que o produto secretado pelas glândulas parótidas e sub-mandibulares (Parotin), é biologicamente ativo, pois provoca diminuição do cálcio sérico em cobaias, diminui e subsequente-mente aumenta o número de leucócitos circulantes e promove a calcificação da dentina dos dentes incisivos. Além disso, o Parotin tem sido, eficazmente, usados em seres humanos, nas enfermidades primárias resultantes das condrodistrofias fetais, artrites deformantes, espongilites e doenças periodontais.

GODLOWSKY (1968) e GODLOWSKY, GAZDA & WITHERS (1971) estudando o papel das glândulas sub-mandibulares na homeostase da insulina, verificaram que a remoção das citadas glândulas, levava a um aumento da ação da insulina e conseqüentemente, à rápida remoção da glicose do sangue. Extratos dessas glândulas, dialisados e fracionados eletroforéticamente, e injetados endovenosamente, causaram inibição da ação insulínica. A administração desse extrato, em seres humanos portadores de diabetes melito, mostrou, em pelo menos três casos, completa remissão das manifestações clínicas do diabetes e retorno da tolerância à glicose dentro dos padrões normais, o que vem confirmar a existência de um fator com ação análoga à da insulina,

produzido pelas glândulas sub-mandibulares.

DAVIDSON, LEIBEL & BERRIS (1969) reconheceram que a hipertrofia e/ou hiperplasia das glândulas parótidas precede, em inúmeros casos, o diabetes.

STEINBERG & GWINUP (1972), propondo-se a estudar o efeito da extirpação bilateral das glândulas sub-mandibulares em cães e sua eventual relação com as respostas glicêmicas associadas às atividades da insulina, concluíram que o papel destas glândulas na patogênese e magnitude do diabetes melito é obscuro; sugeriram, no entanto, que a atividade das glândulas salivares pode ser uma forma de diagnosticar diferentes tipos de diabetes.

Procurando analisar os efeitos da ligação bilateral dos ductos salivares sobre a glicemia de camundongos diabéticos, HOSHINO et alii (1976) concluíram que o efeito hipoglicêmico foi mais acentuado quando os ductos da parótida e sub-mandibular foram simultaneamente ligados. Interpretaram esses resultados como consequência da ausência do fator inibidor da insulina.

Em 1979, GUIMARÃES et alii, propondo-se a estudar os efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de glicogênio hepático em ratos, verificaram que a ausência dessas glândulas promove um significativo aumento da glicemia, com consequente diminuição do teor do glicogênio hepático.

Em 1979, TEIXEIRA estudando os efeitos do Parotin sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos, demonstrou que este princípio ativo apresentou ação em diminuir a hiperglicemia e que a intensidade e duração de seu efeito, é diretamente proporcional à sua concentração. As doses utilizadas pelo autor variavam de 0,10 mg a 0,50 mg/100g de peso corporal.

Mais recentemente, GUIMARÃES et alii (1980) demonstraram que a administração intraperitoneal de uma única dose de Parotin (0,30 mg/100g de peso) em ratos diabéticos trouxe o nível glicêmico próximo à normalidade, enquanto a concentração de glicogênio hepático tornou-se bastante aumentada.

2.2. Participação das glândulas salivares e Parotin sobre o metabolismo proteico

Com relação ao metabolismo proteico, ITO e TSURUFUJI (1953) encontraram uma acentuada diminuição das proteínas totais do soro de coelho, após a administração do Parotin.

MORI (1953), estudando o efeito do Parotin sobre o desenvolvimento geral, observou que a administração de baixas doses dessa substância, além de promover um maior crescimento, corrigia o desenvolvimento imperfeito do embrião de galinha.

SASAKI (1953), OKUDAIRA (1954) e ITO, TSURUFUJI & KUBOTA (1954), estudando a ação do Parotin, na ossificação, verificaram em ratos, um aumento da calcificação e um crescimento acelerado dos tecidos cartilagosos das epífises da tíbia.

A eficácia do Parotin em manter a proliferação das fibras elásticas da aorta, pele e certos tecidos mesenquimais, como sistema retículo endotelial, tecido conjuntivo e órgãos hemopoéticos, foi descrita por TAKIZAWA (1954).

Subsequentemente, YAMAGUCHI (1954) observou, em coelhos e cães, que três meses após a remoção das parótidas e submandibulares, a amostra total de proteínas no soro tinha aumentado consideravelmente. A administração de Parotin nos animais causava uma acentuada diminuição de proteínas séricas.

KONO (1955), NORITA (1955), AKITA (1956) e IYAMAGAWA

(1957) descreveram que, em ratos, o Parotin acelera a maturação do tecido cicatricial. BRACCINI & SIERVO (1962) estudando o processo de reparo de feridas cutâneas, em ratos tratados com Parotin, chegaram a resultados opostos.

YUASA (1957) observou que o Parotin não afeta a atividade da fosfatase alcalina no fígado, mas diminui a atividade da mesma no soro. Por outro lado, encontrou maior atividade da transaminase no fígado e coração, e da catepsina no fígado, sugerindo que o Parotin promove a síntese de proteínas "In Vivo".

Estudando a relação P/O da mitocôndria de hamster, SASE (1958) verificou que o Parotin provocou aumento dessa relação, e que o mesmo ativou anabolicamente o metabolismo proteico e inibiu o seu catabolismo causado pela ação da tiroxina.

OSORIO & KRAEMER (1965), estudando o efeito da administração do Parotin sobre o peso corporal de ratos sialoadenectomizados, demonstraram que o aumento do peso nesses animais pode ser conseguido por um efeito estimulador do Parotin, e que a ausência das glândulas salivares pode levar a profundas modificações da absorção e utilização dos alimentos.

Em 1970, CHATELUT, realizando ligadura dos ductos excretórios e também fazendo a sialoadenectomia, observou que ambos os procedimentos promoviam retardo no crescimento dos animais. Verificou ainda que injeções de Parotin nas concentrações de 0,15 mg a 0,30 mg, cada 2 dias eram incapazes de restabelecer o crescimento normal.

TEIXEIRA, VIZIOLI & GUIMARÃES (1976), pesquisando os efeitos do Parotin e da sialoadenectomia sobre o desenvolvimento do tecido de granulação de ratos, observaram que a ausência das glândulas sub-mandibulares e sub-linguais produziu um atraso no desenvolvimento do tecido. Este atraso foi parcialmente

inibido pela administração intraperitoneal de Parotin (0,15mg/100 g de peso corporal) e totalmente eliminado pela administração de uma dose de 0,30 mg/100g de peso. Em animais normais, a aplicação de uma dose única de Parotin, na concentração de 0,30 mg produziu aumento do número de fibroblastos e da vascularização do tecido de granulação.

2.3. Participação das glândulas salivares e Parotin sobre o metabolismo lipídico

Quanto ao inter-relacionamento entre glândulas salivares, Parotin e metabolismo lipídico, em toda a revista da literatura, foi detectado somente o trabalho de ARAI & YAGI (1958), que observaram que o Parotin regula a relação entre o colesterol livre e colesterol esterificado, como também a relação do colesterol total e fosfolipídeos do soro. Com a administração de uma dose única de 1 a 6 mg de Parotin em coelhos, os autores observaram que o nível do colesterol aumentou no sangue durante as primeiras 24 horas, diminuindo abaixo dos valores iniciais após alguns dias, enquanto que a taxa de fosfolipídeos do soro aumentou acentuadamente. Entretanto, na hipercolesterolemia experimental em coelhos, o colesterol total não só diminuiu como retornou a valores próximos do fisiológico durante uma semana após a administração do Parotin.

2.4. Considerações gerais sobre o metabolismo lipídico

Apesar de ser função vital do tecido adiposo a de atuar como reservatório de gordura, a qual pode ser mobilizada para o provimento de energia, até recentemente pensava-se que esse

tecido era metabolicamente inerte.

Por volta de 1948, através de vários estudos, demonstrou-se que o tecido adiposo não era simplesmente um reservatório inativo. Esse aspecto foi enfatizado por WÉRTHEIMER & SHAPIRO (1948), a despeito da ausência de informações mais precisas concernentes aos enzimas e às vias metabólicas neste tecido.

Um importante obstáculo para a compreensão do metabolismo do tecido adiposo e sua relação com a fisiologia do organismo era a falta de conhecimento do mecanismo pelo qual a gordura era mobilizada do tecido adiposo e transportada para outros tecidos.

FAVARGER (1949) sugeriu que os ácidos graxos livres seriam a forma pela qual a gordura era liberada do tecido adiposo e transportada no sangue.

A primeira e definitiva evidência para suportar essa hipótese originou-se de estudos de GORDON (1957), que correlacionou a concentração de ácidos graxos livres no soro com trocas no estado nutricional, e concluiu que a gordura era liberada do tecido adiposo e transportada no sangue como ácido graxo livre. Observações similares foram relatadas por DOLE (1956).

Este e numerosos estudos subsequentes tornaram possível desenvolver com confiança, métodos relativamente simples, para quantificação de ácidos graxos livres no soro e em outros meios biológicos.

A demonstração de que o ácido graxo liberado e outros processos metabólicos são influenciados por hormônios durante a incubação "In Vitro", despertou interesse para as atividades do tecido adiposo.

Assim, WHITE & ENGEL (1958), estudando "In Vitro" a a-

ção lipolítica da corticotrofina em tecido adiposo de rato, demonstraram que a mesma provoca um aumento na concentração de ácidos graxos não esterificados, tanto no tecido como no meio de incubação, demonstrando uma relação aumentada da lipólise da gordura neutra de dentro da célula. Verificaram também que este efeito foi inibido durante anaerobiose.

WINEGRAD & RENOLD (1958), pesquisando os efeitos da insulina sobre o metabolismo da glicose, piruvato e acetato, em epidídimo de rato, demonstraram que a insulina aumentou marcadamente a captação de glicose em lipídeo solúvel em éter. Em animais diabéticos aloxânicos, os tecidos metabolizaram menos glicose do que os animais normais, mas os efeitos da insulina estavam presentes após três horas de incubação. Também foi observado que a insulina adicionada "In Vitro" não estimulou significativamente o metabolismo do acetato, do piruvato ou dos lipídeos, quando esses substratos estavam presentes sozinhos. Na presença de glicose, entretanto, a insulina estimulou a lipogênese do acetato e do piruvato.

A síntese do glicogênio e do glicerol foram medidos pelo C^{14} da glicose, no tecido adiposo de ratos "In Vitro", por CAHILL, LEBOEUF & RENOLD (1959), na presença e na ausência de insulina. Relataram os autores que a insulina estimulou a síntese de glicogênio em aproximadamente 50 vezes, enquanto que a síntese do glicerol foi estimulada somente 2 a 3 vezes. Foi observado também, que o glicerol origina-se em parte, de derivados metabólicos da via fosfogluconato-oxidativa.

VAUGHAN (1961) descreveu que os hormônios: epinefrina, norepinefrina, ACTH, glucagon e serotonina provocaram aumento da captação da glicose pelo tecido adiposo. Todavia, quando a concentração desses hormônios era diminuída para o nível no

qual a captação da glicose não era demonstrável, a estimulação de ácidos graxos livres era moderadamente evidenciável. Demonstrou ainda que o efeito do 3,5 AMP, adicionado ao meio de incubação era semelhante ao do 5-AMP e oposto ao dos hormônios acima citados.

Com relação ao glucagon, HAGEN (1961) relatou observações idênticas. Ao analisar os efeitos da adrenalina e do glucagon sobre a fosforilase e liberação de ácidos graxos livres, notou que as ações de ambos sobre a fosforilase eram semelhantes, mas sobre a liberação de ácidos graxos livres, o efeito da adrenalina era aproximadamente sete vezes maior.

Em 1962, VAUGHAN, pesquisando sobre a produção e liberação do glicerol pelo tecido adiposo do epidídimo de ratos, incubado "In Vitro", descreveu que a adição de glicose ao meio de incubação, diminuiu a liberação de ácidos graxos livres do epidídimo de ratos mantidos em jejum, mas não alterou a liberação do glicerol, mesmo quando substituiu-se o nitrogênio por oxigênio durante o período de incubação.

Realizando estudos sobre os efeitos da insulina e da adrenalina sobre ácidos graxos livres e produção de glicerol, na presença ou ausência da glicose em tecido gorduroso de epidídimo de rato, pesando entre 40 mg e 100 mg, JUNGAS & BALL (1962) observaram que a adição de 0,1 µg/ml de adrenalina ao meio, produziu um maior acúmulo, tanto de ácidos graxos quanto de glicerol, no meio de incubação. Concluíram, pois, que a adrenalina hidrolisa triglicérides a ácidos graxos e glicerol. Quando, juntamente à adrenalina, foi adicionada insulina (100 uU/ml), houve redução na liberação de ácidos graxos e glicerol para o meio. Isso levou à constatação de que a insulina promove a reesterificação dos ácidos graxos livres formados pela lipólise do te-

cido gorduroso.

BALL & JUNGAS (1963) verificaram que, sob condições aeróbicas, ratos realimentados produzem glicerol numa proporção 10 vezes maior que os ratos alimentados de maneira comum, quando em presença de epinefrina (0,5 ug/ml) no meio de incubação.

Pesquisando os efeitos do hormônio do crescimento e da dexametasona sobre a lipólise, em células gordurosas isoladas de ratos, FAIN, KOVACEK & SCOW (1965) verificaram que o glicerol liberado pela ação do GH e dexametasona, tornou-se bastante aumentado no meio de incubação. Porém, quando a insulina (10 uU/ml) era adicionada, ocorria bloqueio da ação lipolítica dos hormônios. Sugeriram que essa ação lipolítica é secundária aos efeitos dos hormônios sobre a síntese de RNA.

RODBELL & JONES (1966) descreveram que tanto a insulina como a fosforilase C inibiram, na ausência de glicose no meio de incubação, a liberação de ácidos graxos e glicerol que era estimulada por concentração submáxima (0,01 ug/ml) de hormônios lipolíticos (ACTH, epinefrina, glucagon e teofilina). Quando as concentrações hormonais eram altas, tanto a insulina quanto a fosforilase C falhavam em inibir a ação lipolítica.

Resultados idênticos foram observados por FAIN, KOVACEK & SCOW (1966). Deve-se ressaltar o fato que os animais utilizados por esses pesquisadores eram alimentados com ração contendo alta taxa de gorduras (40%), por 5 a 10 dias, e depois deixados em jejum por 18 horas.

A interação entre hormônios tireoideanos e catecolaminas foi estudada "In Vitro" em tecido adiposo sub-cutâneo de 18 pacientes hipotireoideos e de 13 doentes controlados. Foi observado que o efeito lipolítico da noradrenalina foi total-

mente abolido nos indivíduos hipotireoideos, porém, tal efeito era restaurado pela adição de um antagonista α -adrenérgico, a fentolamina (ROSENQUIST, 1972). Essas observações foram confir madas posteriormente, por MAUDE et alii (1974).

A concentração de AMP cíclico no tecido gorduroso do e pidídimo de rato e no meio de incubação foi estudada por FASSI NA et alii (1972), que observaram que houve um grande aumento da concentração do AMP-cíclico, quando em presença de noradre-nalina e teofilina tanto no tecido gorduroso quanto no meio de incubação. Esse efeito todavia foi inibido por algum inibidor da fosforilase oxidativa (oligomícina, 2,4-dinitrofenol ou rote none).

A inter-relação entre dieta e ação da insulina sobre tecido gorduroso foi pesquisada por GOLDRICK, HOFFMANN & REAR-DON (1972). Esses autores concluíram que há um progressivo de-clínio da ação da insulina sobre a resposta do tecido adiposo em ratos com idades de 10 a 34 semanas, os quais eram alimenta-dos com ração "ad libitum". Quando houve substituição dessa ra-ção padrão por ração à base de cereais, o efeito foi prevenido.

Animais alimentados com dieta na qual a taxa de ôleode milho era alta, apresentaram significativa diminuição na recupe-ração de ácidos graxos. Por outro lado, quando o tecido adipo-so desses animais foi incubado "In Vitro", na presença de $U^{14}C$ glicose, a síntese de ácidos graxos tornou-se aumentada. Não foi notada, também, alteração na atividade da lipoproteína li-pase (BORENSZTAJN & GETZ, 1972). Sobre as condições experimen-tais utilizadas, os autores concluíram que a captação de áci-dos graxos pelos lipócitos de ratos alimentados com ração con-tendo gorduras é mais limitada quando comparada com a captação pelos adipócitos de ratos, alimentados com ração livre de gor-

dura.

LAVIS, WILLIAMS & SEATTLE (1973) descreveram que a insulina em altas concentrações (40 mg/ml) provocou um efeito lipolítico sobre células gordurosas isoladas, incubadas "In Vitro". Este efeito, que ocorreu na ausência de glicose no meio de incubação era abolido pela incubação de gamaglobulina anti-insulínica, ou pela prévia tripsinização das células gordurosas.

OKUDA et alii (1974) demonstraram que a lipólise de células adiposas isoladas era aumentada pela presença de dibutiril-AMP cíclico e adrenalina, mas não pelo AMP cíclico. Foi observado também que a taxa da lipase não foi aumentada na presença dessas substâncias. A respeito, sugeriram duas hipóteses: a primeira de que o AMP cíclico poderia ser degradado mais facilmente nas células adiposas que o dibutiril AMP cíclico, e a segunda, que o AMP cíclico poderia não penetrar na membrana celular como o dibutiril AMP cíclico o faz.

Com referência ao pH do meio de incubação, VEGA & DE CINGOLANI (1974) descreveram que a acidose (pH = 6,8) inibia a lipólise induzida pela epinefrina, enquanto a alcalose estimulava-a. A liberação de ácidos graxos livres, todavia, manteve-se diminuída em ambas as condições. Resultados similares foram obtidos quando foi usado o dibutiril AMP cíclico para induzir a lipólise. Quando a adrenalina era incubada juntamente com a aminofilina, havia um aumento da liberação de ácidos graxos e glicerol em pH = 6,8 e 7,4, mas não em pH = 7,8. Concluíram que a reesterificação de ácidos graxos livres decresce em acidose e aumenta em alcalose.

Também o tipo de gordura na dieta foi analisado por pesquisadores. LARKING & NYE (1974) descobriram que em dietas con

tendo óleo de linhaça; a ação da adrenalina sobre a lipólise é muito maior que em dietas contendo óleo de girassol ou gorduras de carne. Esta diferença porém, não está ainda bem determinada. Sabe-se, todavia, que a dieta rica em ácido linoleico, quando comparada à dieta contendo toucinho ou banha, promove, em ratos, diferenças no tamanho dos adipócitos e também na incorporação de precursores para RNA e DNA.

RENNER, KEMMLER & HEPP (1974) descreveram que a insulina em pequenas concentrações (5 a 5.000 uU/ml) interfere na ativação da adenil-ciclase por hormônios lipolíticos. Sugeriram que tal fato decorre da formação de um antagonismo entre a insulina e os hormônios lipolíticos que pode envolver o nucleotídeo.

HANSEN, NIELSEN & GLIEMANN (1974), estudando a interação peso corporal e lipólise, demonstraram que a liberação do glicerol em decorrência da ação do ACTH ou noradrenalina é correlacionado positivamente com o peso do animal. Isto confirma os achados de ZNIDER & SHAPIRO (1971) sobre a liberação de ácidos graxos livres de animais pesando acima de 300 g. Com referência ao tamanho das células, o mesmo ocorre. Todavia, tais observações não são positivas em relação ao glucagon, que apresentou respostas diferentes. Esses autores concluíram que os receptores celulares de glucagon diminuem com o aumento do peso corporal, o que levaria, sem dúvida, a uma diminuição da lipólise.

Com a finalidade de demonstrar ser a adenosina um importante regulador do metabolismo lipídico, FAIN & WIESER (1975) descreveram que a adenosina-desaminase ativa a lipólise e potencializa marcadamente o acúmulo de AMP cíclico. Esses efeitos, porém, são abolidos pela presença da teofilina, devido à

competição entre as substâncias.

SOLOMON (1975) demonstrou que um dos efeitos do diabetes experimental é a redução na atividade da fosfodiesterase do tecido adiposo. Com doses fisiológicas de insulina (100 uU/ml), após 50 minutos de incubação, foi notado um substancial aumento da atividade da fosfodiesterase, tanto em animais normais como em diabéticos.

O metabolismo de ácidos graxos livres no fígado de animais alimentados, em jejum e diabéticos experimentais foi estudado por WITTERS & TRASKO (1979). Foi observado que em animais alimentados o principal produto do metabolismo eram os triglicérides ao passo que em animais em jejum e nos diabéticos eram as cetonas. O glucagon, em concentrações fisiológicas, aumentou a cetogênese e diminuiu a síntese de triglicerídeos do palmitato nos hepatócitos de ratos alimentados. O mesmo não ocorreu nos hepatócitos de ratos em jejum ou em diabéticos experimentais. Concluíram que o glucagon atua também diretamente no fígado para modular o metabolismo de ácidos graxos em animais alimentados, efeito esse que pode ser suprimido pela insulina.

HONEYMAN, LEVY & GOODMAN (1979) estudando os efeitos de vários agentes sobre a fosforilase e a lipólise no tecido adiposo de ratos, observaram que o AMP cíclico, o dibutiril AMP cíclico e o 1-metil-3-isobutil-xantina produziram aumento na atividade da fosforilase a e na produção de glicerol, da mesma forma que a epinefrina, isoproterenol e glucagon. A serotonina por sua vez, falhou em estimular a lipólise; todavia, aumentou a atividade da fosforilase a, produziu aumento no nível de AMP cíclico e ativou o AMP cíclico ligado à proteína quinase. Por outro lado, a adenosina e a prostaglandina E₁, agentes antilipolíticos, diminuíram a resposta lipolítica, mas não interferi

ram na ativação da fosforilase. Estes resultados demonstraram que, sob algumas condições, a atividade da fosforilase e a lipólise podem ser ativadas independentemente dentro dos adipócitos, porém ambas respostas parecem ser mediadas pela ativação do AMP cíclico ligado à proteína quinase que é reguladora da fosforilase e da atividade da lipase.

2.5. Proposição

Conforme pode ser notado pela revista da literatura, o inter-relacionamento entre glândulas salivares e metabolismo de carboidratos e de proteínas, vem sendo estudado por diversos pesquisadores que procuram estabelecer as reais funções dessas glândulas e de seus produtos de secreção. Com relação porém, ao metabolismo lipídico, tal não é observado. Chama particular atenção o fato desse metabolismo ser intimamente ligado ao metabolismo de carboidratos. Assim, propõe-se neste trabalho:

1) Avaliar "In Vitro", os possíveis efeitos do Parotin sobre a liberação do glicerol do tecido gorduroso do epidídimo de ratos normais e diabéticos, em relação à modelos experimentais conhecidos (insulina e adrenalina);

2) Determinar "In Vitro", as concentrações de ácidos graxos livres, no plasma de animais normais e diabéticos, sob influência do Parotin, em relação também, à insulina.

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nesta pesquisa 48 ratos machos (Rattus norvegicus, albinus, Wistar) com 3 meses de idade, pesando em média 220 gramas, no início da experimentação.

Os animais foram alimentados antes e durante o período experimental com ração balanceada padrão* e água "ad libitum".

O presente trabalho foi desenvolvido em 2 modelos experimentais:

3.1. Determinação do glicerol - Estudo "In Vitro".

3.2. Determinação de ácidos graxos livres - Estudo "In Vivo".

3.1.1. Sequência do experimento "In Vitro"

Foram utilizados 24 ratos, distribuídos, casualmente em 2 grupos, da seguinte forma:

GRUPO I - Controle - constituído por 12 animais, que receberam via intraperitoneal, apenas solução fisiológica;

GRUPO II - Diabéticos experimentais - constituído por 12 animais os quais receberam, via intraperitoneal, 125 mg de aloxana**/Kg de peso.

Tanto a solução fisiológica quanto a aloxana utilizadas, não ultrapassaram o volume máximo de 1,0 ml.

* Ração Balanceada Ceres, Piracicaba

** Monohidrato de Aloxana - Carlo Erba

3.1.2. Produção de ratos diabéticos

Para a produção de ratos diabéticos, foi administrado, intraperitonealmente, após jejum prévio de 16 horas (KASS e WAISBREN, 1945), aloxana a 2% em solução salina hipotônica (NaCl 0,45% p/u) na quantidade de 125 mg/kg de peso corporal. O volume máximo de solução de aloxana injetado foi de 1,0 ml.

Após a administração da aloxana, o alimento foi restituído aos animais e, com a finalidade de prevenir eventuais hipoglicemias, foi colocada à disposição dos mesmos uma solução de glicose a 15%, a qual foi retirada depois de 24 horas (TOMITA, 1973).

A constatação do diabetes foi verificada através da glicemia (método da Ortotoluidina) realizada aos 3 e 6 dias após a administração da aloxana e também através da determinação da glicosúria, feita pela técnica da glicofita*, nos mesmos dias.

Foram considerados diabéticos aloxânicos e posteriormente utilizados no experimento, os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg%, após a 2ª dosagem da glicemia.

Para as dosagens glicêmicas, após anestesia por inalação com éter sulfúrico em uma campânula de vidro, coletou-se o sangue da ponta da cauda dos animais, por aspiração, segundo técnica detalhada no apêndice deste trabalho.

A seguir, os animais de ambos os grupos foram sacrificados por decapitação e o tecido adiposo da cabeça do e

* Glico-fita - Eli Lilly do Brasil Ltda.

pidídimo foi removido e mantido em solução Krebs Ringer, em banho de gêlo.

Cada bloco de tecido adiposo do epidídimo foi repartido em 2 porções de 150 a 200 mg cada uma e colocadas em frascos de Warburg, para incubação.

Para evitar-se possíveis variações entre as porções distais e proximais do epidídimo, foi realizado um rodízio das mesmas, nos diferentes meios de incubação.

3.1.3. Sistemas experimentais empregados

O sistema experimental para determinação do glicerol, sob o efeito da insulina, Parotin e adrenalina, tanto para animais do Grupo I (contrôle), quanto para os do Grupo II (diabéticos aloxânicos), constou de (Tabela 1):-

a) Frasco nº 1:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,9 ml
Insulina 0,1 ml (1)
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

b) Frasco nº 2:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,9 ml
Parotin 0,1 ml (2)
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

c) Frasco nº 3:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,8 ml
Insulina 0,1 ml
Parotin 0,1 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

d) Frasco nº 4:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 3,0 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

e) Frasco nº 5:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,8 ml
Adrenalina 0,1 ml (3)
Insulina 0,1 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

f) Frasco nº 6:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,8 ml
Adrenalina 0,1 ml
Parotin 0,1 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

g) Frasco nº 7:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 2,9 ml
Adrenalina 0,1 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

h) Frasco nº 8:

Tampão Krebs Ringer Fosfato (pH = 7,4) 3,0 ml
Porção do epidídimo $\pm$ 150 - 200 mg

(1) Insulina simples (Lilly) 40 unidades, dissolvida em solução fisiológica numa concentração de 30 mu/ml.

(2) Parotin (Teikoku Hormone MFG.Co, Ltda. Japan), preparado em solução fisiológica numa concentração de 4,5 mg/ml.

(3) Adrenalina, preparada em solução fisiológica numa concentração de 3,0 ug/ml.

Após 60 minutos de agitação à temperatura de 37°C, as porções do epidídimo foram retiradas dos frascos de Warburg, e o glicerol do meio foi determinado pelo método de KORN (1954).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectronic 20 - Bausch e Lomb), densidade ótica de 570 nm e os valores obtidos, expressos em micromol de glicerol/hora / grama de tecido.

TABELA 1 - Sistemas Experimentais empregados, para determinação do glicerol, tanto para animais controle, quanto para animais diabéticos.

Frascos meios de incubação								
	1	2	3	4	5	6	7	8
TKRF	X	X	X	X	X	X	X	X
INSULINA	X		X		X			
PAROTIN		X	X			X		
ADRENALINA					X	X	X	
TECIDO(EPIDÍDIMO)	X	X	X	X	X	X	X	X

Como pode ser observado na tabela acima, o conteúdo de glicerol, posteriormente encontrado nos frascos de números 4 e 8, serviu como controle para os demais sistemas experimentais.

(3) Adrenalina, preparada em solução fisiológica numa concentração de 3,0 ug/ml.

Após 60 minutos de agitação à temperatura de 37°C, as porções do epidídimo foram retiradas dos frascos de Warburg, e o glicerol do meio foi determinado pelo método de KORN (1954).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectronic 20 - Bausch e Lomb), densidade ótica de 570 nm e os valores obtidos, expressos em micromol de glicerol/hora / grama de tecido.

TABELA 1 - Sistemas Experimentais empregados, para determinação do glicerol, tanto para animais controle, quanto para animais diabéticos.

Frascos meios de incubação	1	2	3	4	5	6	7	8
TKRF	X	X	X	X	X	X	X	X
INSULINA	X		X		X			
PAROTIN		X	X			X		
ADRENALINA					X	X	X	
TECIDO(EPIDÍDIMO)	X	X	X	X	X	X	X	X

Como pode ser observado na tabela acima, o conteúdo de glicerol, posteriormente encontrado nos frascos de números 4 e 8, serviu como controle para os demais sistemas experimentais.

3.2.1. Sequência do Estudo "In Vivo"

Foram utilizados 24 ratos, divididos casualmente em 4 grupos, da seguinte forma (Tabela 2):

GRUPO I - Contrôles - constituído por 6 animais os quais receberam, via intraperitoneal, apenas solução fisiológica;

GRUPO II - Diabéticos aloxânicos - constituído por 6 ratos que receberam, via intraperitoneal, dose única de aloxana na concentração de 125 mg/kg de peso corporal;

GRUPO III - Diabéticos aloxânicos + Insulina - constituído também de 6 animais tornados diabéticos pela administração de aloxana, nas mesmas condições que o grupo anterior e aos quais foi administrado ainda, dose única de insulina, intraperitonealmente, na concentração de 2,5 U/100g de peso corporal (TEIXEIRA, 1979);

GRUPO IV - Diabéticos aloxânicos + Parotin - constituído por 6 animais, tornados diabéticos à semelhança dos ratos dos Grupos II e III e que receberam, intraperitonealmente, Parotin, na concentração de 0,45 mg/100 g de peso corporal (TEIXEIRA, 1979).

TABELA 2 - Distribuição dos animais nos grupos e drogas administradas.

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	DROGAS ADMINISTRADAS
I - Contrôles	6	Sol. fisiológica (NaCl 0,9%)
II - Diabéticos	6	Aloxana (125 mg/kg peso)
III - Diab. + Insul.	6	Aloxana (125 mg/kg de peso) + Insul. (2,5 U/100 g de peso)
IV - Diab. + Parotin	6	Aloxana (125 mg/kg de peso) + Parotin (0,45 mg/100 g de peso)

Tanto a insulina quanto o Parotin utilizados, foram preparados em solução fisiológica e o volume máximo injetado foi de 0,5 ml.

A obtenção dos ratos diabéticos (Grupo II, III e IV), obedeceu ao mesmo procedimento do estudo "In Vitro".

3.2.2. Determinação dos ácidos graxos livres

Para a determinação dos ácidos graxos livres, após anestesia dos animais por inalação com éter sulfúrico em uma campânula de vidro, coletou-se o sangue da ponta da cauda dos ratos, do mesmo modo que para o estudo "In Vitro".

A seguir o sangue foi centrifugado, o plasma separado e dosou-se a concentração de ácidos graxos livres pelo método de DOLE & MEINERTZ (1960) em microbureta adaptada. Os valores obtidos foram expressos em micromol/litro de plasma.

Nos animais dos 4 grupos experimentais foram realizadas dosagens dos ácidos graxos livres nos intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24 e 32 horas.

Os animais dos Grupos III (diabéticos + Insulina) e IV (diabéticos + Parotin), após a coleta de sangue no tempo 0 (zero) receberam respectivamente, via intraperitoneal, injeção de insulina e de Parotin, nas concentrações já citadas.

Importante ressaltar que em todos os animais dos 4 grupos experimentais, foram realizadas dosagens glicêmicas - (método da ortotoluidina) em todos os intervalos de tempo nos quais realizou-se a coleta de sangue para as determinações dos ácidos graxos livres.

CAPITULO IV - RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudo "In Vitro"

Os resultados da determinação do glicérol liberado do tecido adiposo do epidídimo de ratos normais para o meio de in cubação, podem ser observados nas tabelas 3 e 4 e Gráficos 1 e 2.

Na tabela 3 verificam-se as ações da insulina, do Paro tin e da associação da insulina com o Parotin, adicionados ao meio de incubação, sobre o tecido adiposo incubado, relaciona- dos com o tecido adiposo controle.

Pode ser observado que tanto a insulina como o Parotin promoveram uma inibição da liberação do glicérol do tecido adi- poso para o meio de incubação, da ordem de 7,86%, enquanto a associação da insulina com o Parotin estimulou a liberação do glicérol em 2,85%.

Por outro lado, na tabela 4, onde encontram-se os efei- tos da adrenalina e das associações entre adrenalina e insuli- na e adrenalina e Parotin sobre a liberação de glicérol do te- cido gorduroso do epidídimo de ratos normais, pode ser veri- ficado que, enquanto a adrenalina estimulou em 59,84% a libera- ção do glicérol para o meio de incubação, a associação entre a drenalina e insulina, inibiu em 30,09% a taxa de liberação. A associação da adrenalina com o Parotin também mostrou eficácia em inibir a taxa de glicérol liberado para o meio (28,78%).

Essa inibição verificada, tanto para a associação com a insulina, como para o Parotin, diz respeito à estimulação ob- servada pela adição de adrenalina ao meio de incubação, e não em relação ao tecido gorduroso do epidídimo controle.

Esses resultados podem ser vistos ainda, nos Gráficos

1 e 2, onde as colunas menores significam os valores do glicérol encontrados nos meios de incubação do tecido gorduroso do epidídimo de ratos normais e as colunas maiores são relativas ao tecido gorduroso do epidídimo de animais diabéticos.

Na tabela 5, observa-se o ocorrido com a liberação do glicérol do tecido gorduroso do epidídimo de ratos diabéticos para o meio de incubação, sob influência da insulina, do Parotin e da associação da insulina com o Parotin adicionados ã e s e m e i o, quando comparado com a liberação do glicérol do tecido gorduroso tomado como controle.

Como pode ser verificado, a insulina e o Parotin i n i b i r a m a liberação do glicérol em 19,19% e 13,37% respectivamente enquanto que a associação insulina + Parotin estimulou a liberação em 2,15%.

Por outro lado, observando a tabela 6, onde encontramos as ações da adrenalina e das associações da adrenalina com a insulina e com o Parotin, sobre a liberação de glicérol do tecido gorduroso do epidídimo de ratos diabéticos para o meio de incubação, nota-se que enquanto a adrenalina estimulou a l i b e r a ç ã o do glicérol em 25,34%, em relação ao controle, ambas as associações, com insulina e com Parotin, inibiram a liberação do glicérol em 23,95% e 22,84% respectivamente, quando c o m p a r a d a s com a ativação dada pela presença de adrenalina no meio de incubação.

Pode ser observado ainda, nas tabelas 4 e 6, que as a s s o c i a ç õ e s da adrenalina com insulina e Parotin, tanto em animais normais como em animais diabéticos, relacionadas com seus respectivos controles, mostraram uma ativação maior (25,75% e 31,06% respectivamente) nos ratos normais quando comparadas com os resultados obtidos dos ratos diabéticos (1,39% e 2,50% res-

pectivamente).

Com relação aos Gráficos 1 e 2, referentes às tabelas 3 e 5, e 4 e 6 respectivamente, nota-se que não se observam diferenças significantes entre os animais de um mesmo Grupo, devido ao desvio padrão ser bastante grande em decorrência da variação individual encontrada nos animais. Todavia, pode ser verificado que a liberação do glicerol do tecido adiposo do epidídimo de animais diabéticos, para o meio de incubação, foi aproximadamente três vezes maior que o ocorrido para animais normais.

TABELA 3 - Valores da determinação do glicerol liberado do tecido adiposo do epidídimo de ratos normais, no meio de incubação, sob influência da insulina e do Parotín. Valores expressos em μMol de glicerol/hora/grama de tecido.

Sistema Experimental	I	P	I + P	C
Ratos				
1	1,54	1,52	1,70	1,59
2	1,36	1,43	1,41	1,58
3	1,23	1,22	1,24	1,33
4	1,12	1,24	1,40	1,26
5	1,39	1,35	1,69	1,69
6	1,15	1,00	1,22	0,98
Média	1,29 $\pm 0,18$	1,29 $\pm 0,18$	1,44 $\pm 0,21$	1,40 $\pm 0,26$
% Ativ.	2,85			
% Inib.	7,86	7,86		

I - INSULINA

P - PAROTIN

I+P - INSULINA + PAROTIN

C - CONTRÔLE

TABELA 4 - Valores da determinação do gliceroi liberado do tecido adiposo do epidídimo de ratos normais no meio de incubação, sob influência da adrenalina, insulina e Parotin. Valores expressos em uMol de gliceroi/hora/grama de tecido.

Sistema Experimental	A + I	A + P	A	C
Ratos				
7	1,39	1,97	1,81	1,06
8	1,63	1,60	1,77	1,36
9	1,90	1,71	2,30	1,38
10	1,56	1,57	1,91	1,43
11	2,23	2,17	2,91	1,84
12	1,29	1,39	2,00	0,89
Média	1,66 ±0,34	1,73 ±0,28	2,11 ±0,43	1,32 ±0,32
% Ativ.	59,84			
% Inib.	34,09	28,78		

A + I = ADRENALINA + INSULINA

A + P = ADRENALINA + PAROTIN

A = ADRENALINA

C = CONTRÔLE

TABELA 5 - Valores da determinação do glicérol liberado do tecido adiposo do epidídimo de ratos diabéticos, no meio de incubação, sob influência da insulina e do Parotin. Valores expressos em uMol de glicérol/hora/grama de tecido.

Sistema Experimental	I	P	I + P	C
Ratos				
1	3,79	4,19	6,68	5,87
2	3,99	5,34	6,32	5,89
3	4,28	4,25	4,34	4,56
4	2,64	2,68	2,85	2,89
5	5,06	5,11	5,49	5,47
6	2,76	2,58	2,79	3,14
Média	3,75 ±0,92	4,02 ±1,17	4,74 ±1,69	4,64 ±1,34
% Ativ.	2,15			
% Inib.	19,19	13,37		

I = INSULINA

P = PAROTIN

I + P = INSULINA + PAROTIN

C = CONTRÔLE

TABELA 6 - Valores da determinação do glicero1 liberado do tecido adiposo do epidídimo de ratos diabéticos no meio de incubação, sob influência da adrenalina, in sulina e Parotin. Valores expressos em uMol de glicero1/hora/grama de tecido.

Sistema Experimental	A + I	A + P	A	C
Ratos				
7	2,80	3,40	3,56	2,88
8	4,60	4,35	5,95	4,26
9	2,58	2,39	3,09	2,69
10	4,40	4,69	4,92	4,18
11	4,57	4,94	5,23	5,01
12	2,90	2,36	4,29	2,56
Média	3,64 ±0,97	3,68 ±1,14	4,50 ±1,07	3,59 ±1,01
% Ativ.	23,34			
% Inib.	23,94	22,84		

A + I = ADRENALINA + INSULINA

A + P = ADRENALINA + PAROTIN

A = ADRENALINA

C = CONTRÔLE

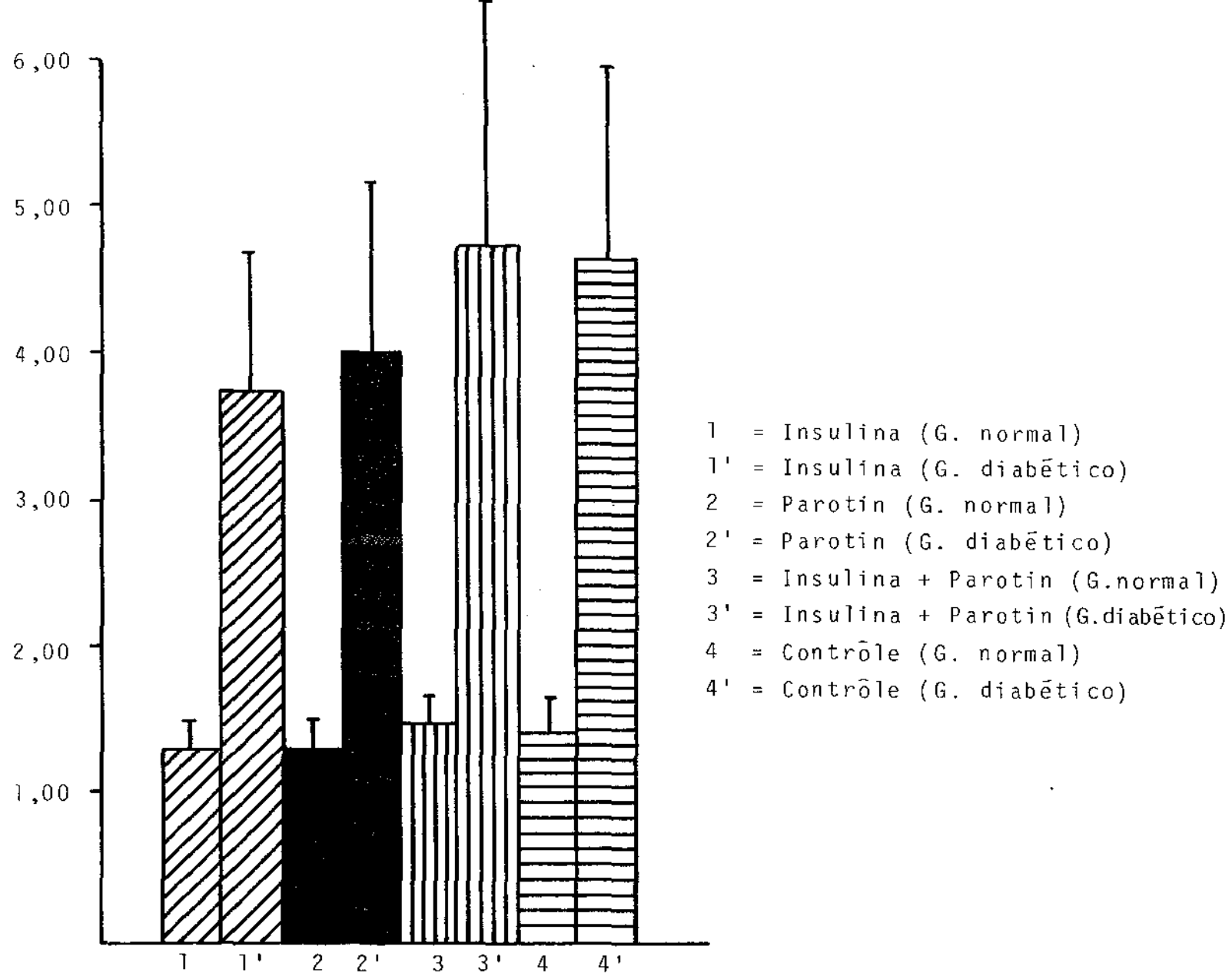


GRÁFICO 1:- Valores ($\mu\text{mol/h/g}$ de tecido) da determinação do glicérol liberado do tecido adiposo de animais normais e diabéticos, no meio de incubação, sob influência da insulina e do Parotín.

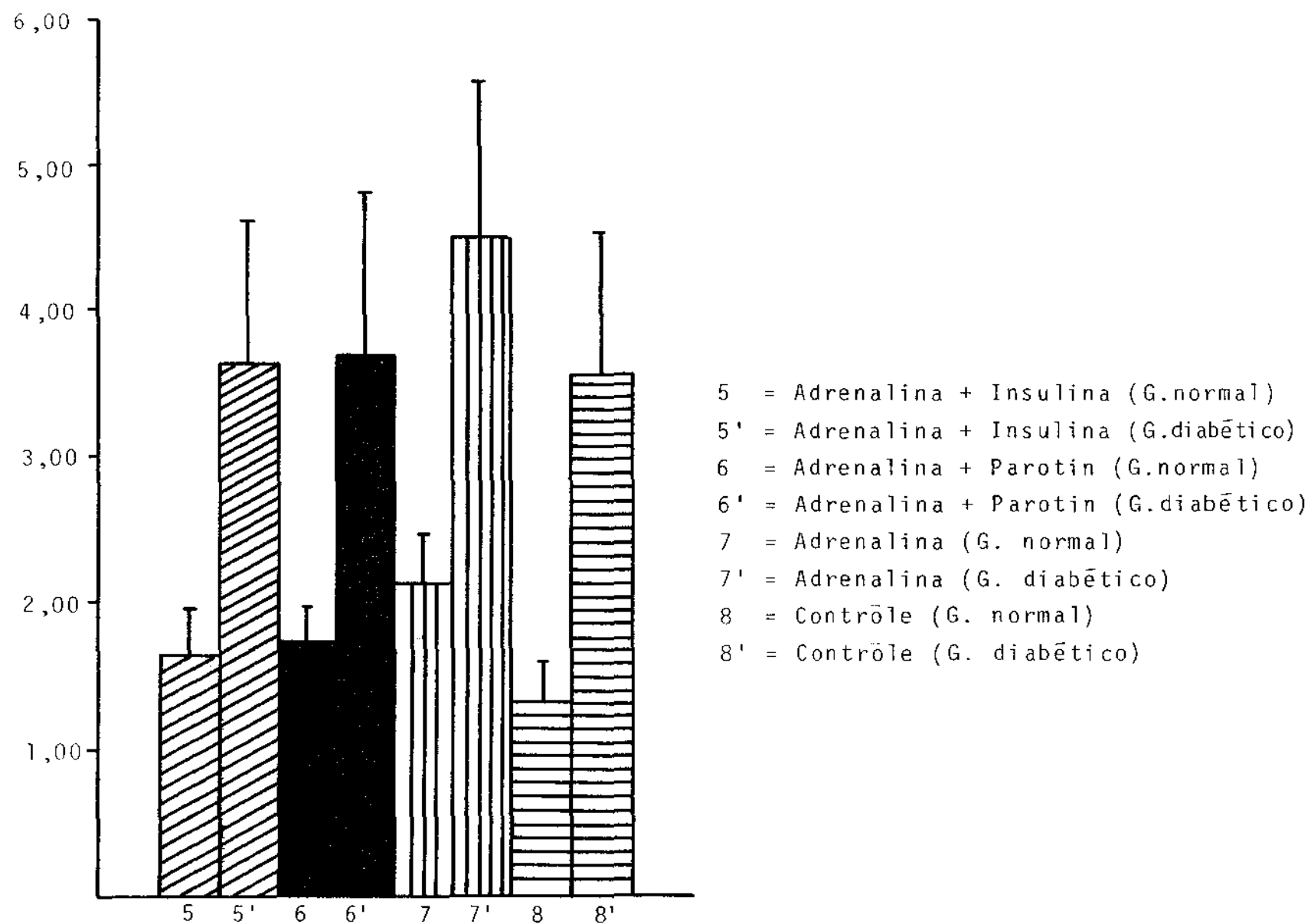


GRÁFICO 2:- Valores ($\mu\text{mol/h/g}$ de tecido) da determinação do glicerol liberado do tecido adiposo de animais normais e diabéticos no meio de incubação, sob influência da adrenalina, insulina e Parotín.

4.2. Estudo "In Vivo"

Os resultados da determinação de ácidos graxos no plasma de animais controle e diabéticos, e também de animais diabéticos que receberam doses únicas de Parotin e insulina, podem ser observados nas tabelas 7, 8, 9 e 10 e Gráfico 7.

Na tabela 7 e Gráfico 3, encontram-se dados das dosagens de ácidos graxos livres nos intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12 e 24 horas, bem como as respectivas médias glicêmicas de 6 animais do grupo controle (Grupo I). Os dados referentes às dosagens de ácidos graxos estão expressos em mmol/litro de plasma e pode-se observar que os limites encontrados situam-se entre 0,41 e 0,77 mmol/litro de plasma. A média glicêmica por sua vez, encontra-se próxima a 90,0 mg%.

Nos animais diabéticos (Grupo II), cujos resultados das dosagens de ácidos graxos e da glicemia podem ser vistos na tabela 8 e Gráfico 4, observa-se que os limites encontrados para ácidos graxos estão entre 0,59 e 1,16 mmol/litro de plasma, o que indica um aumento de aproximadamente 46% na concentração de ácidos graxos livres, relacionado ao Grupo controle. Quanto à glicemia, o valor médio encontrado foi de 300 mg%, mostrando o estado hiperglicêmico dos animais. Pode ser verificado ainda, nesta tabela, que a média da concentração de ácidos graxos, no plasma dos animais deste Grupo aumentou ligeiramente à medida que as dosagens foram sucedendo-se nos diferentes intervalos de tempo. O mesmo todavia, não ocorreu com a glicemia, que apresentou valores menores a intervalos de tempo maiores.

Quanto aos animais do Grupo III, diabéticos experimentais, que receberam uma dose única de insulina, administrada a pós ter sido realizada a coleta de sangue para as dosagens de

ácidos graxos e glicose, para o tempo 0 (zero), pode-se verificar na tabela 9 e Gráfico 5 que ocorreu uma queda acentuada dos níveis de ácidos graxos a partir da 4.^a hora da injeção, de aproximadamente 56% em relação ao resultado médio obtido no tempo 0 (zero). Esta queda ocorreu juntamente com a redução da glicemia, que mostrou seu menor valor (198,5mg%) também na 2.^a dosagem ou seja, na 4.^a hora após a administração da insulina. A partir do intervalo de tempo de 8 horas, as concentrações de ácidos graxos começaram a aumentar concomitantemente com a tendência da glicemia em retornar a seus níveis iniciais.

Na tabela 10 e Gráfico 6, encontram-se os resultados das dosagens de ácidos graxos e glicose no plasma de 6 animais diabéticos experimentais, que receberam uma única dose de Parotin (Grupo IV), administrada intraperitonealmente, após ter sido realizada a colheita de sangue para as dosagens relativas ao tempo 0 (zero).

Pode ser observado que houve um grande decréscimo na concentração de ácidos graxos livres, já a partir da 2.^a dosagem (intervalo de tempo de 4 horas), em todos os animais do Grupo. Esta diminuição, em termos médios, foi da ordem de 61%, aumentando essa porcentagem até a 4.^a dosagem (intervalo de tempo de 12 horas), quando então os valores começaram a subir, diminuindo a porcentagem em relação ao tempo 0 (zero) nas 5.^a e 6.^a dosagens (intervalo de tempo de 24 e 32 horas).

Com relação à glicemia média, pode ser notado que já na 2.^a dosagem, 1.^a após ter sido administrado o Parotin, houve uma ligeira redução, para atingir o ponto máximo no intervalo de tempo de 8 horas (3.^a dosagem) quando ocorreu concomitantemente, uma diminuição na concentração média de ácidos graxos livres no plasma. Com 12 horas após a aplicação do Parotin, a glicemia já estava próxima a seus valores iniciais.

TABELA 7 - Valores obtidos das dosagens de ácidos graxos ($\mu\text{Mol/litro}$ de plasma) dos animais do Grupo I, nos diferentes intervalos de tempo, bem como valores glicêmicos médios ($\text{mg\%}$ de sangue) nos mesmos intervalos de tempo.

Tempo (hs) Ratos	0	4	8	12	24	32
1	0,46	0,55	0,59	0,63	0,68	
2	0,56	0,72	0,68	0,68	0,77	
3	0,50	0,59	0,59	0,59	0,55	
4	0,41	0,50	0,68	0,63	0,72	
5	0,41	0,55	0,72	0,72	0,63	
6	0,59	0,59	0,63	0,72	0,72	
Médias	0,48 $\pm 0,07$	0,58 $\pm 0,07$	0,64 $\pm 0,05$	0,66 $\pm 0,05$	0,67 $\pm 0,07$	
Glicemia	89,5	90,0	89,0	88,0	88,0	

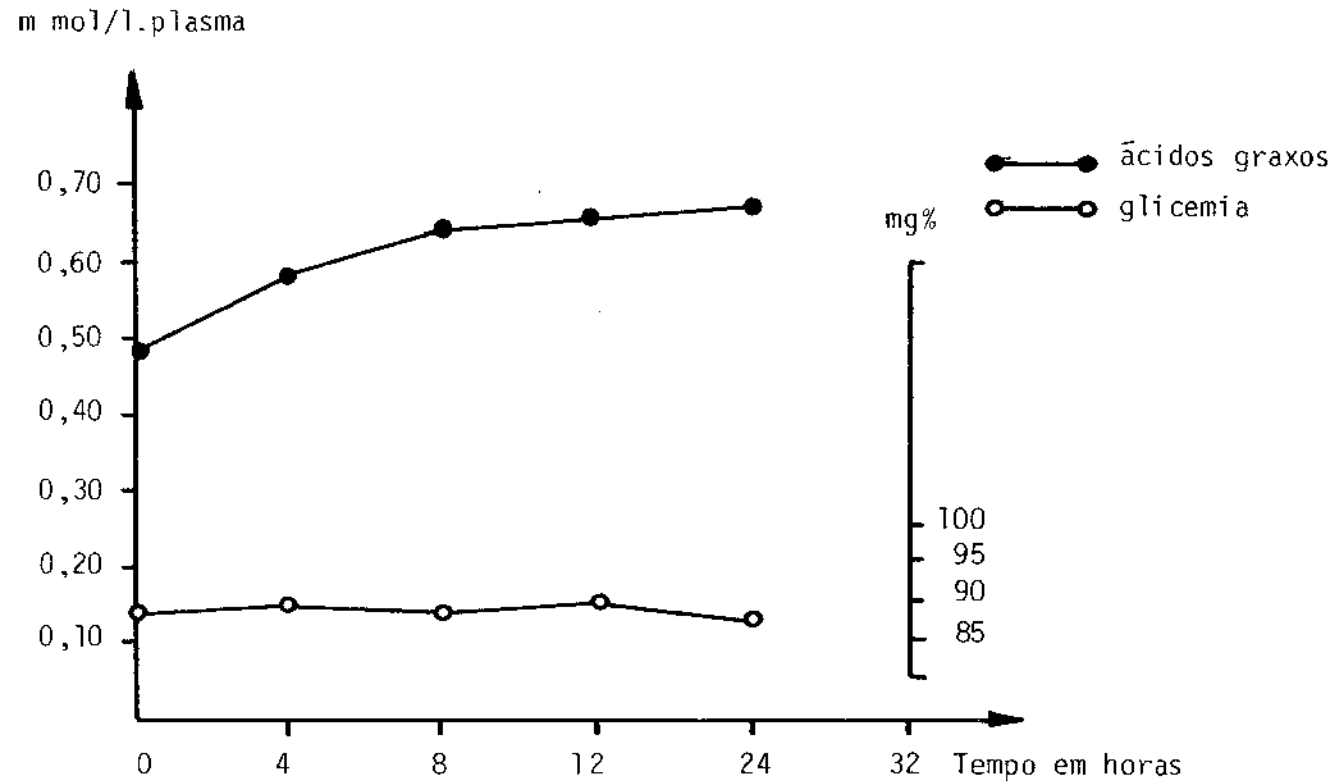


GRÁFICO 3:- Valores médios de dosagens de ácidos graxos (mmol/litro de plasma) e valores glicêmicos (mg% de sangue) obtidos dos animais do Grupo I.

TABELA 8 - Valores obtidos das dosagens de ácidos graxos (uMol/litro de plasma) dos animais do Grupo II, nos diferentes intervalos de tempo, bem como valores glicêmicos médios (mg% de sangue) nos mesmos intervalos de tempo.

Tempo (hs) Ratos	0	4	8	12	24	32
1	0,68	0,72	0,81	0,77	0,77	0,72
2	0,77	0,77	0,72	0,77	0,81	0,85
3	0,79	0,85	1,03	1,12	1,07	1,16
4	0,72	0,81	0,81	0,85	0,85	0,90
5	0,94	0,85	0,94	0,94	0,99	0,99
6	0,63	0,59	0,68	0,72	0,72	0,72
Médias	0,75 ±0,10	0,76 ±0,09	0,83 ±0,13	0,86 ±0,15	0,86 ±0,13	0,89 ±0,17
Glicemia	320,5	330,0	318,0	300,0	280,0	270,0

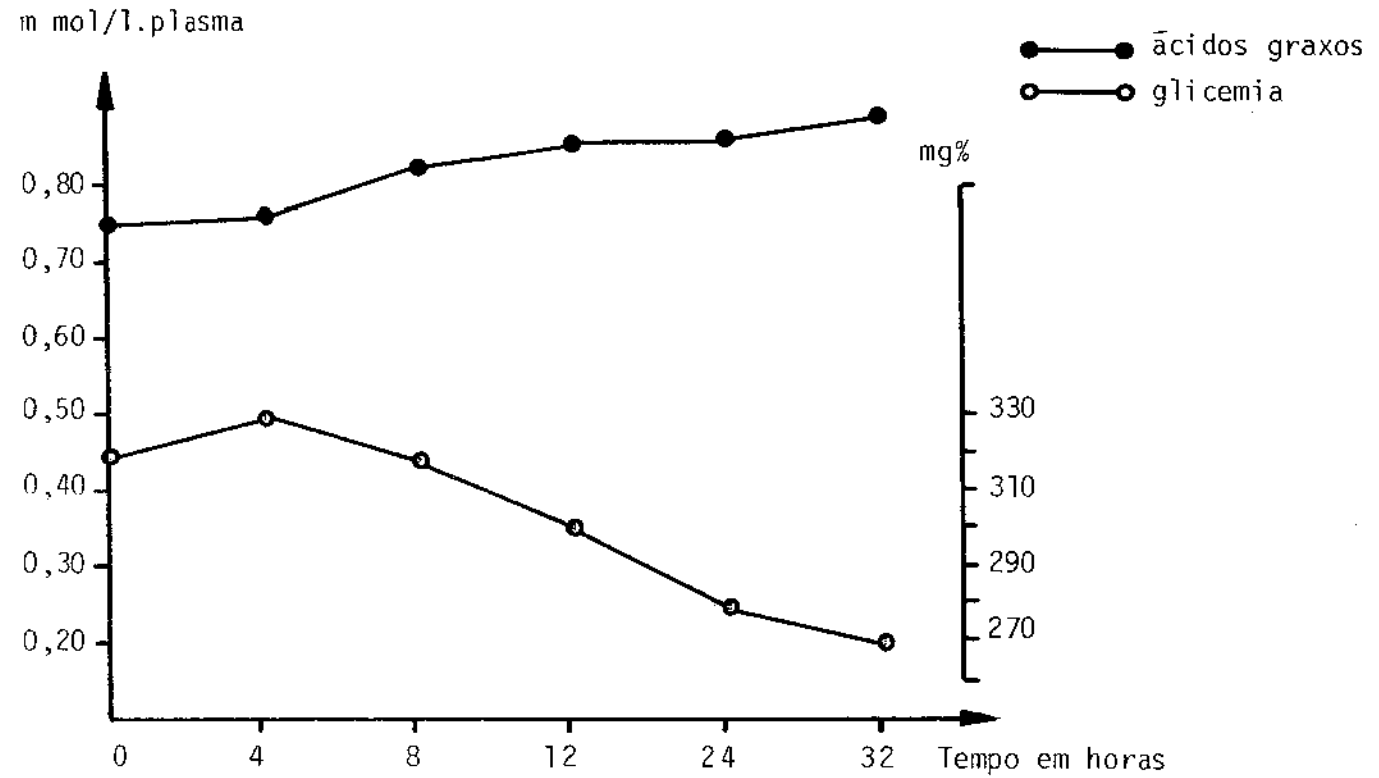


GRÁFICO 4:- Valores médios de dosagens de ácidos graxos (m mol/litro de plasma) e valores glicêmicos médios (mg% de sangue) obtidos dos animais do Grupo II.

TABELA 9 - Valores obtidos das dosagens de ácidos graxos (uMol/litro de plasma) dos animais do Grupo III, nos diferentes intervalos de tempo, bem como valores glicêmicos médios (mg% de sangue) nos mesmos intervalos de tempo.

Tempo (hs) Ratos	0	4	8	12	24	32
1	0,56	0,02	0,02	0,11	0,11	0,19
2	0,69	0,06	0,19	0,19	0,19	0,33
3	0,65	n.d.	0,02	0,15	0,37	0,33
4	0,78	0,15	0,24	0,24	0,24	0,41
5	0,69	0,11	0,11	0,19	0,24	0,37
6	0,75	0,02	0,06	0,15	0,28	0,37
Médias	0,68 ±0,07	0,07 ±0,05	0,10 ±0,09	0,17 ±0,04	0,23 ±0,09	0,33 ±0,08
Glicemia	336,5	198,5	212,5	256,2	300,0	306,0

n.d. = não detectável (aquém do limite do método utilizado)

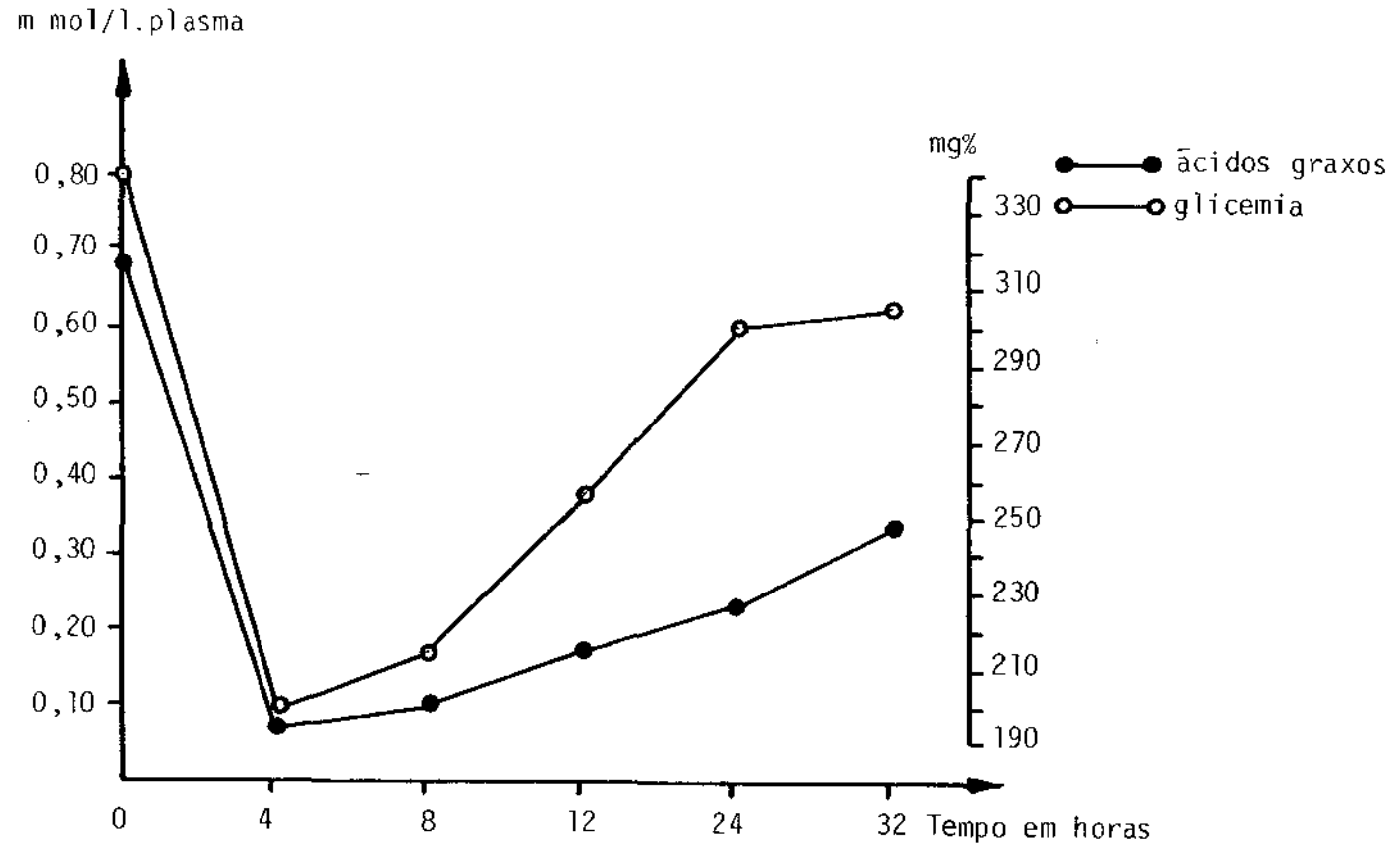


GRÁFICO 5:- Valores médios de dosagens de ácidos graxos (m mol/litro de plasma) e valores glicêmicos médios (mg% de sangue) obtidos dos animais do Grupo III.

TABELA 10 - Valores obtidos das dosagens de ácidos graxos (uMol/litro de plasma) dos animais do Grupo IV, nos diferentes intervalos de tempo, bem como valores glicêmicos médios (mg% de sangue) nos mesmos intervalos de tempo.

Tempo (hs) Ratos	0	4	8	12	24	32
1	0,78	0,02	0,02	0,06	0,06	0,33
2	1,09	0,41	0,11	0,06	0,06	0,33
3	0,68	0,19	0,11	0,19	0,33	0,35
4	0,55	0,11	0,02	0,06	0,11	0,41
5	0,50	n.d.	n.d.	0,02	0,06	0,15
6	0,65	0,15	0,06	0,06	0,11	0,28
Médias	0,70 ±0,21	0,17 ±0,14	0,06 ±0,04	0,09 ±0,06	0,12 ±0,10	0,30 ±0,09
Glicemia	348,0	292,0	226,4	271,4	330,0	352,0

n.d. = não detectável (aquém do limite do método utilizado)

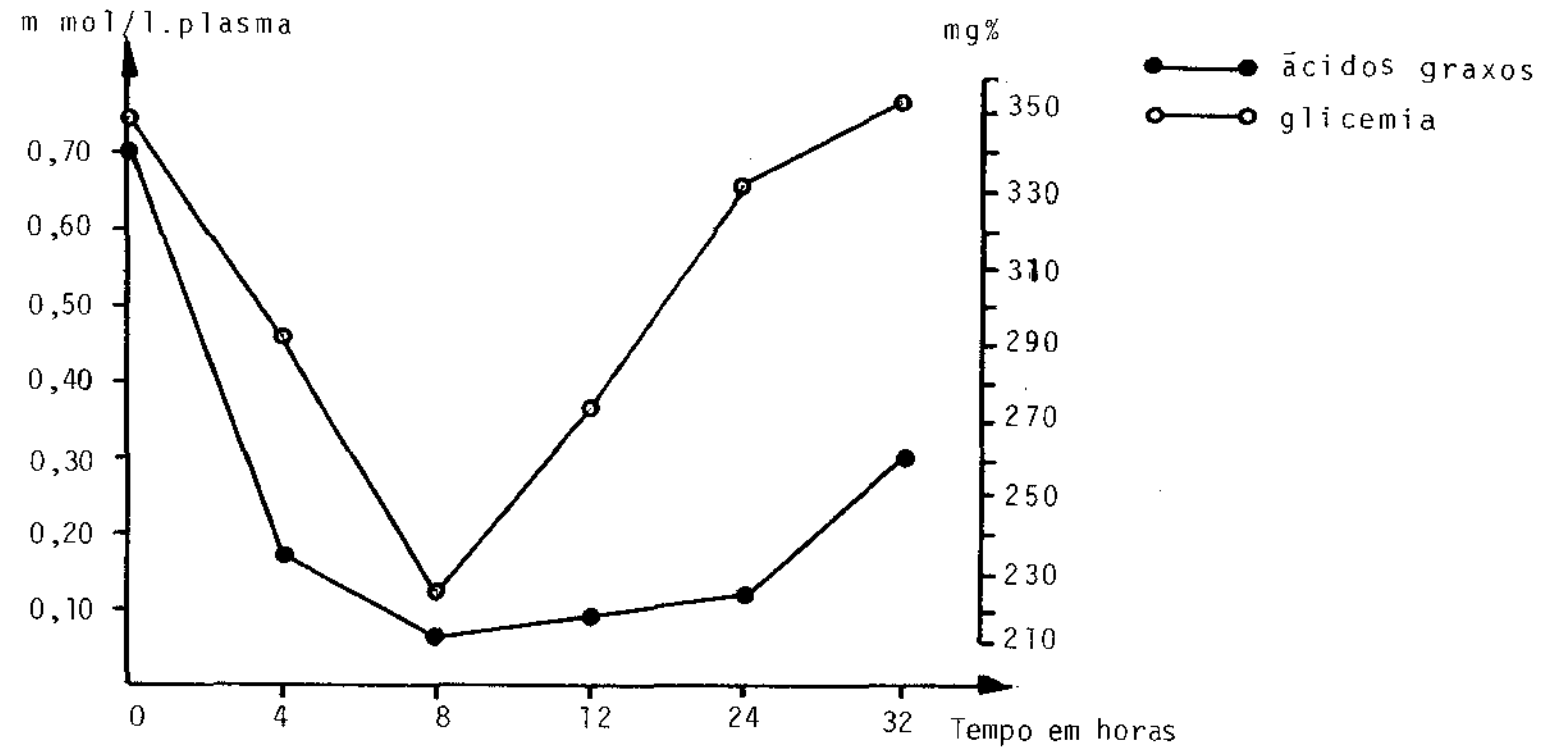


GRÁFICO 6:- Valores médios de dosagens de ácidos graxos (mmol/litro de plasma) e valores glicêmicos médios (mg% de sangue) obtidos dos animais do Grupo IV.

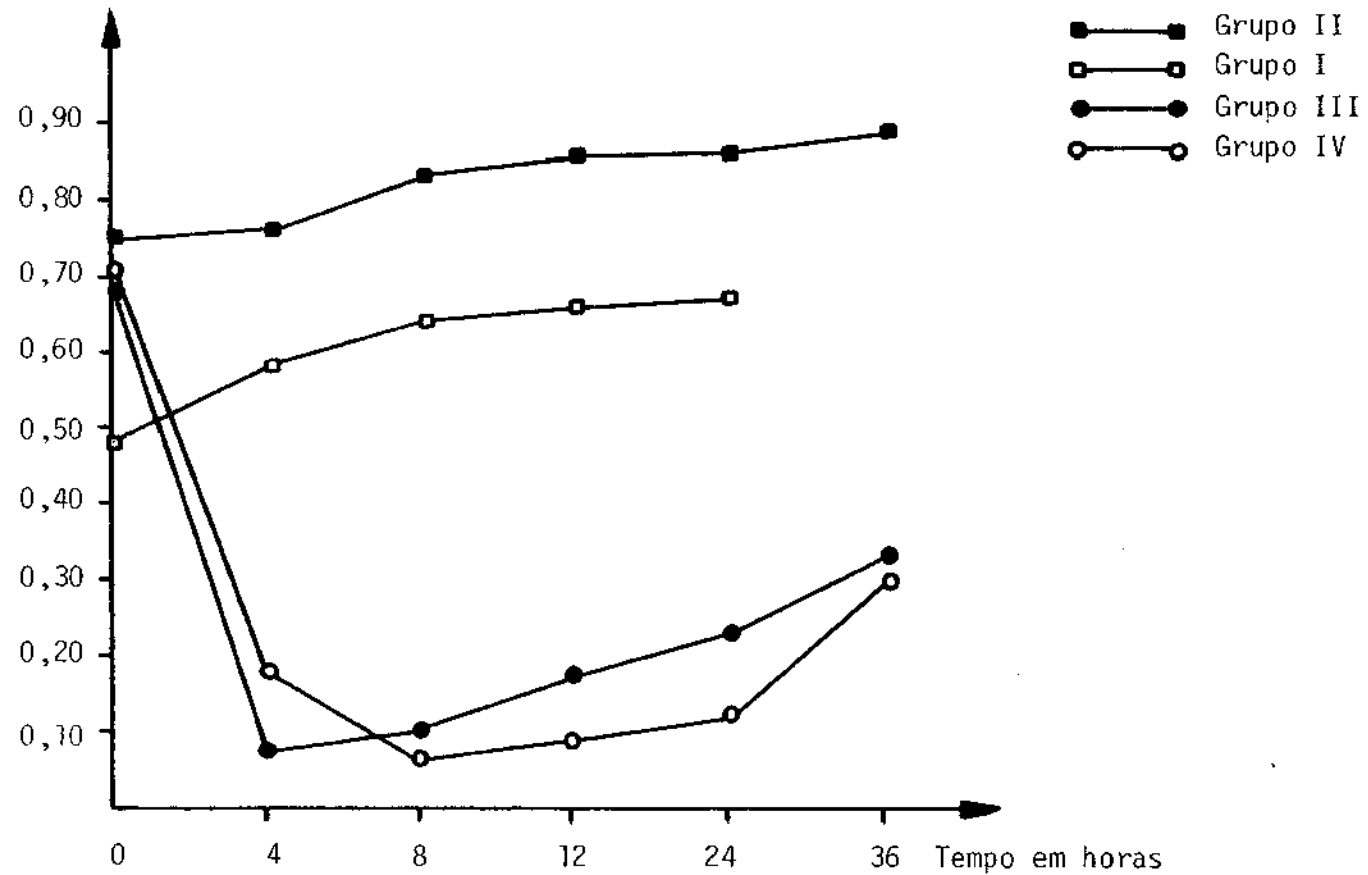


GRÁFICO 7:- Valores obtidos das dosagens de ácidos graxos livres (mmol/litro de plasma) dos animais dos 4 grupos experimentais, nos diferentes intervalos de tempo.

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudo "In Vitro"

Para que os efeitos do Parotin sobre o metabolismo lipídico possam ser avaliados, impõe-se a comparação desta substância com outras que apresentam efeitos marcadamente expressivos e já comprovados.

Dessa forma, conforme descrito na proposição desse trabalho, realizou-se estudos entre o princípio ativo Parotin e a insulina, a qual apresenta ação em favorecer o armazenamento lipídico, e também a adrenalina, que tem efeito lipolítico, promovendo conseqüentemente, a liberação de ácidos graxos e glicerol para o plasma e outros meios biológicos.

Quando o tecido adiposo é incubado "In Vitro", o glicerol e os ácidos graxos são liberados para o meio porque são produtos da hidrólise de triglicerídeos. Os ácidos graxos podem ser reesterificados, dependendo principalmente do suprimento de alfa-glicerofosfato. O glicerol por sua vez não é metabolizado e o seu acúmulo no meio, durante a incubação, é indicativo da lipólise. Esse foi o motivo pelo qual realizou-se a dosagem do glicerol e não dos ácidos graxos quando do estudo "In Vitro".

Com relação ao jejum, não observado neste trabalho, a despeito de amplamente citado por vários autores (WHITE & ENGEL, 1958; VAUGHAN, 1961; FAIN, KOVACEK & SCOW, 1965; MAUDE et alii, 1974) foram realizadas, antes da execução da pesquisa propriamente dita, várias experiências, deixando os animais sem alimentação por 16, 24 e 48 horas e também, conforme o indicado por BALL & JUNGAS (1963), por 72 horas e após ração suplementar desengordurada, e não foram notadas alterações marcan-

tes nos resultados. Optou-se, então, por deixar os animais alimentados (HAGEN, 1961; OKUDA et alii, 1973; SOLOMON, 1974; RENNER, KEMMLER & HEPP, 1974 e WITTERS & TRASKO, 1979), principalmente com relação ao Grupo diabético cuja sobrevivência já era precária.

No que concerne ao tecido adiposo utilizado, o tecido gorduroso do epidídimo, o mesmo foi incubado em um pedaço único (WHITE & ENGEL, 1958; VAUGHAN, 1961 e 1962; JUNGAS & BALL, 1962; FASSINA et alii, 1972 e SOLOMON, 1974), a despeito de outros autores realizarem seus estudos com células adiposas separadas (RODBELL & JONES, 1966; LAVIS, WILLIAMS & SEATTE, 1973; VEGA & DE CINGOLANII, 1974; RENNER, KEMMLER & HEPP, 1974 e WITTERS & TRASKO, 1979). Também neste caso, foram executadas ambas as técnicas e os resultados foram semelhantes. Quanto ao peso do tecido adiposo, atuou-se numa faixa entre 150 mg e 200 mg devido ao fato de nos animais diabéticos experimentais o tecido tornar-se bastante reduzido, como ocorre em estados hiperglicêmicos, em decorrência do desvio metabólico e também por indicação de vários autores (WINEGRAD & RENOLD, 1958; CAHILL, LEBOEUF FLINN, 1959; HAGEN, 1961; BALL & MERRIL, 1961; FRERICHES & BALL, 1962; FASSINA et alii, 1972; GOLDRICK, HOFFMANN REARDON, 1972 e ZINMAN & HOLLEMBERG, 1973), e por observações próprias.

Conforme pode ser notado na tabela 3, verifica-se que o Parotin promoveu, da mesma forma que a insulina, uma inibição da lipólise, quando comparado ao controle.

Como se sabe, a insulina tem dois efeitos muito importantes para favorecer o armazenamento lipídico: primeiro, ativa a proteína-lipase, desse modo acelerando a velocidade de hidrólise dos triglicérides absorvidos e favorece seu armazena -

mento. Ao mesmo tempo facilita a entrada de glicose nas células adiposas, e estas convertem uma pequena quantidade de glicose em triglicérides, que são armazenados junto com os lipídeos da dieta; segundo e talvez o mais importante, supre o alfa-glicerofosfato, produto de metabolização da glicose, que fornece a porção glicerol para os triglicérides recém-formados ; sem isso nenhum lipídeo poderia ser armazenado.

As ações hipoglicemiantes de extratos de glândulas salivares, dentre eles o Parotin, têm sido relatadas por diversos autores (HIKI et alii, 1929, 1930, 1932 e 1934; OGATA;1934; GODLOWSKY & CALANDRA, 1960; FLEMING, 1962; HOSHINO et alii , 1976; GUIMARÃES et alii, 1979 e TEIXEIRA, 1979).

Admitindo-se que o Parotin apresenta efeitos semelhantes aos da insulina no que se refere ao metabolismo de carboidratos, poder-se-ia supor que este princípio ativo atue sobre o metabolismo lipídico da mesma forma que a insulina, promovendo o armazenamento de lipídeos por meio de ativação da lipoproteína-lipase ou mesmo aumentando a disponibilidade do alfa-glicerofosfato.

Por outro lado, conforme pode ser visto nos resultados (tabela 3) a associação do Parotin com a insulina não mostrou ser efetivo em promover a lipogênese. Ao contrário, por sinal, nota-se que houve inclusive um ligeiro aumento da lipólise , quando comparado com o controle.

Sugerindo-se um efeito sinérgico de ambos, torna-se permitido pensar em termos de disputa dos "sítios" de ação pelas substâncias em questão, ainda mais se levarmos em consideração que ambos apresentam uma semelhança estrutural bastante grande.

Segundo TEIXEIRA (1979), em relato a respeito do meta-

bolismo de carboidratos, a insulina ocuparia o seu "sítio" próprio de receptores com mais facilidade que o Parotin, de tal forma que o efeito resultante não seria uma somatória das ações da insulina + Parotin e sim somente da insulina. Não foi, todavia o que ocorreu na presente pesquisa, relacionada ao metabolismo lipídico. A nosso ver, o que deve acontecer quando essas duas substâncias são incubadas conjuntamente, é uma inibição recíproca, não existindo portanto somatória de efeitos e muito menos efeito sobre os receptores específicos.

Na observação da tabela 4, nota-se que a estimulação da lipólise pela adrenalina foi em parte (aproximadamente 50%) inibida quando incubada juntamente com a insulina e Parotin.

É sabido que os principais efeitos da adrenalina e outros hormônios (Noradrenalina, hormônio adrenocorticotrófico, hormônio do crescimento, glucagon e outros) sobre o tecido adiposo são o de promover a lipólise, com liberação de ácidos graxos e glicerol e também aumentar a atividade da fosforilase e do 3,5-AMP (GORDON & CHERKES, 1958; WHITE & ENGEL, 1958; RIZACK, 1961; HAGEM, 1961; VAUGHAN, 1962; JUNGAS & BALL, 1962; FAIN, KOVACEK & SCOW, 1965; RODBELL & JONES, 1966; RENNER, KEMMLER & HEPP, 1974). O aumento na atividade da fosforilase é mediado pela ação do 3,5-AMP, cuja produção é acelerada pela adrenalina.

A insulina, quando adicionada ao meio de incubação, juntamente com a adrenalina, promoveu redução na liberação de glicerol para o meio talvez por auxiliar a reesterificação do mesmo (JUNGAS & BALL, 1962) ou talvez por bloquear a ação lipolítica do hormônio (FAIN, KOVACEK & SCOW, 1966), inibindo a ação da fosforilase, da mesma forma como o fazem a oligomicina, o 2,4-dinitrofenol e o rotenone, conforme demonstrado por FAS-

SINA et alii (1972).

Os resultados desta pesquisa, com relação à ação da in sulina, concordes com os obtidos pelos autores acima citados, podem perfeitamente serem extrapolados para a compreensão dos resultados obtidos com a adição do Parotin ao meio de incubação contendo adrenalina.

Convém também observar, que as ações da insulina e do Parotin, no caso presente, poderiam induzir à formação de um antagonismo entre cada um deles e a adrenalina, interferindo na ativação da adenil ciclase.

Quanto aos animais diabéticos experimentais, nos quais não existe disponibilidade de insulina, os lipídeos são insufi cientemente sintetizados pelas células, ou simplesmente nem o são. Primeiro, quando não existe insulina a glicose não penetra satisfatoriamente nas células adiposas, de modo que as pequenas quantidades requeridas de acetil CO-A e NADPH para a sín tese de lipídeos derivam da glicose. Segundo, a falta de glicose nas células reduz grandemente a disponibilidade de alfa-glicerofosfato, o que dificulta aos tecidos a formação de triglicerídeos.

Nas tabelas 5 e 6 observam-se os efeitos da insulina, Parotin e adrenalina sobre o tecido adiposo incubado de animais diabéticos experimentais. Conforme pode ser notado, houve um grande acréscimo na concentração de glicerol liberado para o meio, o que era de se esperar, devido à ausência de insulina, impedindo a glicólise, com consequente formação de alfa-glicerofosfato importante para promover o armazenamento dos triglicérides.

Da mesma forma ocorrida com o grupo controle, tanto a insulina quanto o Parotin, mostraram ser efetivos em diminuir a

lipólise; também a associação insulina + Parotin não mostrou e feitos cumulativos e sim provocou um aumento ligeiro da mesma, o que vem sugerir a ação competitiva entre ambos.

Com relação à ação da adrenalina, como pode ser verificado na tabela 6, a mesma provocou pequeno aumento da lipólise em comparação com o grupo contróle, o que pode ser explicado pela depleção lipídica do epidídimo, como acontece em estados hiperglicêmicos prolongados.

No entanto, a associação da adrenalina com a insulina e com o Parotin induziu uma diminuição da concentração de glic^{erol} no meio de incubação, o que pode ser compreendido devido ao fato de ambos promoverem uma diminuição na hiperglicemia , com conseqüente aumento da concentração da glicose para as cê-lulas adiposas, o que, por sua vez, permitiu um pequeno armazenamento de lipídeos.

Os resultados obtidos neste trabalho, quanto à ação da insulina e da adrenalina sobre o metabolismo lipídico de animais diabéticos, são concordantes com os observados por WINE-GRAD & RENOLD (1958); CAHILL, LEBOEUF & RENOLD (1959), JUNGAS & BALL (1962) e SOLOMON (1975).

5.2. Estudos "In Vivo"

Para o estudo "In Vivo" sobre os possíveis efeitos do Parotin sobre o metabolismo lipídico, escolheu-se realizar as dosagens dos ácidos graxos livres, ao invés de dosar-se o glic^{erol}, pelo motivo de especificidade do método utilizado.

As dosagens de ácidos graxos livres foram realizadas, a princípio, a intervalos de 4 horas, e não a intervalos de tempo menores, devido ao fato de necessitar-se de aproximadamente

2,0 ml de sangue para dosar ao mesmo tempo os ácidos graxos livres e a glicemia. Durante esse período, os animais receberam somente água.

Conforme observa-se na tabela 7 e Gráfico 3, quanto aos animais do Grupo I (contrôles), as médias das dosagens dos ácidos graxos livres, de 6 animais, nos diferentes intervalos de tempo, elevaram-se ligeiramente com as sucessivas dosagens, até atingirem um platô ao redor da 3ª dosagem. A glicemia por sua vez não se alterou durante o período experimental, mantendo-se dentro dos padrões normais, fisiológicos.

A elevação observada na 2ª e 3ª dosagens, ocorrida com todos os animais, aumentando a média, talvez possa ser atribuída a uma maior liberação de catecolaminas, o que por certo promoveria um aumento da lipólise com conseqüente hidrólise de triglicerídeos, e portanto, liberação de ácidos graxos para o plasma.

Quanto aos animais diabéticos experimentais (Grupo II), somente foram utilizados os que, ao início do experimento, apresentavam médias glicêmicas iguais ou superiores a 300,0mg%, valor esse, considerado como indicativo de um quadro diabético que dificilmente, sem tratamento adequado, permite uma recuperação do animal.

Como pode ser notado na tabela 8 e Gráfico 4, os valores médios das dosagens dos ácidos graxos dos animais diabéticos indica um aumento de 46% no nível dos mesmos, quando comparado com o valor médio das dosagens obtidas dos animais contrôles.

O fenomeno ocorrido com os animais do Grupo I, ou seja, o aumento da liberação de ácidos graxos nas dosagens de 4 e 8 horas (2ª e 3ª) ocorreu também com os animais do Grupo II. A

glicemia também apresentou ligeiro aumento na 2.^a dosagem.

É importante ressaltar-se que, a partir da 3.^a dosagem, à medida que a glicemia diminuiu, a concentração de ácidos graxos livres aumentou no plasma. Essa queda da glicemia pode ser atribuída ao fato de os animais permanecerem sem alimentação durante o período experimental e não a uma maior utilização da glicose pelas células, pois a ausência da insulina não permitiria que isso ocorresse.

Quanto aos animais do Grupo III (diabéticos experimentais + insulina), pode ser observada na tabela 9 e Gráfico 5, uma brusca diminuição da concentração de ácidos graxos livres já na 1.^a dosagem após a administração da insulina, o mesmo ocorrendo com a glicemia. Isso era de se esperar, pois o efeito da insulina sobre a glicemia e de um modo geral, sobre o metabolismo de carboidratos, é fato de há muito conhecido. Como já foi observado neste trabalho, é claro que se a insulina administrada é capaz de restaurar o suprimento de glicose nas células, óbvio seria dizer que com a utilização da mesma, ocorreria produção do alfa-glicerofosfato, que por sua vez, permitiria o armazenamento lipídico, diminuindo conseqüentemente a liberação de ácidos graxos para o plasma. Também, conforme afirmado na discussão sobre o estudo "In Vitro", a insulina pode ter ativado a lipoproteína lipase e provocado a reesterificação dos ácidos graxos.

De mesma forma, os animais do Grupo 4 (diabéticos experimentais + Parotin) também mostraram, conforme pode ser observado na tabela 10 e Gráfico 6, uma acentuada queda, tanto na concentração de ácidos graxos no plasma, quanto na glicemia.

Partindo-se do princípio que as glândulas salivares (e por conseqüência o Parotin, conforme anotado na discussão so-

bre o estudo "In Vitro"),apresentam sobre o metabolismo de carbohidratos efeitos próximos aos apresentados pela insulina (FLAUM, 1932; FERRETI, 1936; DOBREFF, 1936; HALMOS & SOMOGIY,1962; DAVIDSON et alii, 1969; GARCIA, BLACKARD & TRAIL, 1971 e TEIXEIRA, 1979) em animais diabéticos, e dada a íntima relação entre esse metabolismo e o dos lipídeos, pode-se, por hipótese, sugerir efeitos análogos aos permitidos àquele hormônio, principalmente na captação de glicose pelas células.

Os resultados desta pesquisa, quanto ao efeito do Parotin na diminuição da glicemia de ratos diabéticos, são concordes com aqueles encontrados por FLEMING (1962). Todavia, as afirmativas desse autor, nas quais o Parotin promoveu hiperplasia e hipertrofia das ilhotas de Langerhans, não foram concordes com os resultados obtidos por GUIMARÃES (1976), que observou através de cortes histológicos, que o pâncreas de animais diabéticos experimentais, que receberam o Parotin, não apresentou regeneração celular. Autores outros (DUNN, et alii, 1943; DUNN & Mc LETCHIE, 1943; GOMORI & GOLDNER, 1943; GOLDNER & GOMORI, 1943; BAILEY & BAILEY, 1943; LAZAROW & PALAY, 1946 ; CAVALLERO, 1947; RUANGSIRI, 1949 e SOLOMON et alii, 1974), pesquisando a respeito da produção de diabetes experimental em ratos, através da aloxana, demonstraram que, efetivamente, essa substância promove necrose irreversível das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, a qual se completa nas 48 horas após a sua administração, persistindo por um período de 176 dias. Dessa forma, seria praticamente impossível a regeneração das células beta, sob o efeito do Parotin, bem como a estimulação da ação da insulina.

Com relação ao efeito do Parotin sobre o metabolismo lipídico, existe concordância entre os achados deste trabalho e

os verificados por ARAY & YAGI (1958), que demonstraram que na hipercolesterolemia, o colesterol total não só diminuiu, como retornou a valores próximos do fisiológico, após a administração do Parotin.

Não se pode deixar de esclarecer ainda, que os efeitos da insulina, tanto sobre a concentração de ácidos graxos quanto sobre a glicemia, atingiram o pico maior logo nas primeiras 4 horas após sua administração, enquanto para o Parotin esse ponto somente foi conseguido 8 horas após sua administração (Gráficos 5 e 6). Também deve-se observar, com relação à concentração de ácidos graxos não esterificados que, enquanto a insulina, à medida que tinha seu nível diminuído no sangue, provocava um suave retorno da concentração de ácidos graxos no plasma, o mesmo não era observado com relação ao Parotin que provocou, quando talvez de seu desaparecimento do sangue, um brusco aumento na concentração dos ácidos graxos livres.

Apesar dos efeitos da insulina e do Parotin serem semelhantes, existem entre eles diferenças sensíveis, tais como estruturação química, peso molecular, mecanismos de resbsorção, afinidade por receptores e outras. Estas diferenças indicam em termos mais conclusivos que, no que concerne ao interrelacionamento glândulas salivares e metabolismo lipídico, há necessidade de estudos mais aprofundados. É esse, portanto, um campo de pesquisa, aberto e interessante, que deve ser mais explorado em busca de novos conhecimentos no sentido de melhores esclarecimentos.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise e a discussão dos resultados obtidos através dos estudos "In Vitro" e "In Vivo", permitem afirmar-se que:

1. O princípio ativo do Parotin promove, efetivamente, uma diminuição na liberação de glicerol para o meio de incubação, tanto em tecido gorduroso de epidídimo de animais normais quanto de animais diabéticos;

2. A associação entre Parotin e insulina, não mostrou efeito antilipolítico em ambos os experimentos "In Vitro" (animais normais e diabéticos);

3. O Parotin promove uma diminuição na liberação de ácidos graxos livres para o plasma, nos animais diabéticos experimentais;

4. O Parotin mostrou ser efetivo em diminuir a hiperglicemia de animais diabéticos.

CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, R. & NARBAITZ, R. Action of rat submaxillary gland extracts on neural tube growth in orgão culture. J. Embryol. exp. Morph., 14: 281-6, 1965.
2. AKITA, K. J. Jap. stomat. Soc., 6, 1956. Apud BRACCINI, C. & SIERVO, R., op. cit. ref. 13.
3. ANGELETTI, P.U.; LEVI-MONTALCINI, R.; CALISSANO, P. The nerve growth factor (NGF): Chemical proprieties and metabolic effects. Adv. Enzymol., 31: 51-75, 1968.
4. ARAI, Y. & YAGI, T. Protein and cholesterol metabolism. - Clin. Endocr., 6: 198-16, 1958.
5. ARRUDA VEIGA, M.C.F. Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal. Campinas, 1979. (Tese (Mestrado) - Inst. Biologia - U.E.C.).
6. ATTARDI, D.C.; SCHLESINGER, M.J.; SCHELESINGER, S. Submaxillary gland of mouse: Properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro. Science, 156: 1253-5, 1967.
7. BALL, E.G. & MERRIL, M.A. A manometric assay of Insulin - and some results of the aplication of the method to sera

- and islet - containing tissues. J. Biol. Chem., 1: 1961.
8. BALL, E.G. & JUNGAS, R.L. Studies on the metabolism of adipose tissue. XIII- The effect of anaerobic conditions and dietary regime on the response to insulin and epinephrine. Biochemistry, 2: 586-91, 1963.
9. BAST, E.M. & MILLS, K.S. Mouse submaxillary gland extract as a growth stimulator and orientor of chick cardiac cells in vitro. Growth, 72: 295-301, 1963.
10. BIRNKRANT, W.B. The influence of the parotid gland on blood sugar. J. Lab. clin. Med., 26: 1009-11, 1941.
11. _____ & SHAPIRO, R. The influence of a parotid extract on the blood sugar and structure of the pancreas of the rat. J. Lab. clin. Med., 27: 510-8, 1942.
12. BORENSZTAJN, J. & GETZ, S. The contribution of lipogenesis "in situ" to the accumulation of fat by rat adipose tissue. Biochim. Biophys. Acta, 280: 86-93, 1972.
13. BRACCINI, C. & SIERVO, D.R. La parotina ormone delle ghiandole salivari. IV- Sua influenza sul processo de guarigione delle ferite sperimentali del ratto. Riv. ital. Stomat., 17: 556-80, 1961.
14. CAHILL, H.G.; LEBOEUF, B. & RENOLD, A.E. Studies on Rat adipose tissue "in vitro". J. Biol. Chem., 234: 2540-3, 1959.

15. CAHILL, H.G.; LEBOEUF, B. & FLINN, R.B. Studies on rat adipose tissue in vitro. J. Biol. Chem., 235: 1246-50, - 1959.
16. CAVALLERO, C. Applications de la méthode colchicinique à l'étude du diabète alloxanique, chez le rat. Revue belge Path., 18 323-32, 1947.
17. CHATELUT, D.B.J.; DARNAULT, J.; DUBSC, Q.J.; DAVID, J.E. - Effects de l'ablation des glandes sous-maxillaires et de l'administration de "Parotine" sur la croissance du jeune rat. Endocrinologie, 164: 1680-4, 1970.
18. COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocitotoxic antiserum. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 46: 306-11, - 1960.
19. _____. Isolation of a mouse sub maxillary gland protein incisor eruption and eyelid opening in newborn animal. - J. biol. chem., 237(5): 1552-62, 1962.
20. DAVIDSON, D.; LEIBEL, B.S.; BERRIS, B. A symptomatic parotid gland enlargement in diabetes mellitus. Ann. intern. Med., 70: 31-8, 1969.
21. DE TAKÄTS, G. Ligation of tail of pancreas in juvenile diabetes. Endocrinology, 14: 255-62, 1930.

22. DOBREFF, M. Compensatory hypertrophy of the parotid gland - in presence of hypofunction of pancreatic islands. Dt.-med. Wschr., 62: 67-70, 1936.
23. DOLE, V.P. Apud VAUGHAN, M., 1961, op. cit. ref. 104.
24. _____ & MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain - fatty acids in plasma and tissues. J. Biol. Chem., 235: 2595-9, 1960.
25. DUNN, J.S. & Mc LETCHIE, N.G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. Lancet, 2(6265) 384-7, 1943.
26. _____; KIRKPATRICK, J.; Mc LETCHIE, N.G.B. & TELLER, S.V. Necrosis of Langerhans produced experimentally. J. Path. Bact., 55: 245-57, 1943.
27. FAIN, J.N.; KOVACEK, V.P. & SCOW, R.O. Effects of growth - hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. J. Biol. Chem., 240: 3522-9, 1965.
28. _____; _____ & _____. Antilipolytic effect of insulin in isolated fat cells of the rat. Endocrinology, 78: 773-8, 1966.
29. _____ & WIESER, P.B. Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis ,

- and glucose metabolism of fat cells. J. Biol. Chem., 250: 1027-34, 1975.
30. FARRONI, B. Funzione endocrina delle glandole salivari ed eliminazione degli zucheri. Riv. crit. clin. med., 12: 577-93, 1911.
31. FASSINA, G.; DORIGO, P.; BADETTI, R. & VISCO, L. Effect inhibitors on cyclic adenosine monophosphate synthesis in rat adipose tissue. Biochemical Pharmacology, 21: 1633-9, 1972.
32. FAVARGER, P. Apud VAUGHAN, M., 1961, op. cit. ref. 104.
33. FERRANNINI, A. Glycosialoreh e de s cr tion interne des glands salivaires. Revue m d., Paris, 31: 269-73, 1911.
34. FERRETI, G. Su due casi di ipertrofia, dele parotidi in diabetici. G. Clin. med., 17: 1149, 1936.
35. FLEMING, H.S. Parotin and growth centers of femurs and incisors in mice. J. dent. Res., 38: 374-85, 1959.
36. FRERICHs, H. & BALL, E.G. Studies on the metabolism of adipose tissue. Astination of phosphorylase by agents which stimulate lipolysis. Biochemistry, 1: 501-9, 1962.
37. GARCIA, A.R.; BLACKARD, W.G. & TRAIL, M.L. Submaxillary -

- gland removal: Effects on glucose and insulin homeostasis. Archs. Otolar., 93: 597-8, 1971.
38. GAULT, S.D. The effect of parotidectomy on blood sugar levels in the rat and mouse. J. Lab. clin. Med., 43: 119-22, 1954.
39. GIASMAN, F. Actividad endócrina de las glandulas salivares. Semana med., 10: 1287-90, 1964.
40. GODLOWSKY, Z.Z. The role of submaxillary glands in homeostasis of insulin. Diabetes, 17: 325-6, 1968.
41. _____ & CALANDRA, J.C. Salivary glands as endocrine organs. J. appl. Physiol., 15: 100-5, 1960.
42. _____; GAZDA, M.; WITHERS, B.T. Ablation of salivary glands as initial step in the management of selected forms of diabetes mellitus. Laryngoscope, 81(8): 1337-58, 1971.
43. GOLDNER, M.G. & GOMORI, G. Alloxan diabetes in the dog. - Endocrinology, 33: 297-308, 1943.
44. GOLDRICK, R.B.; HOFFMANN, C.C. & REARDON, M. Effects of diet on the metabolism and the responses "in vitro" to insulin of epididymal adipose tissue and hemidia phragms. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 50: 289-308, 1972.
45. GOLJANITZKI, J.A. Zur frage des eratzes der endokrinen drueses. Arch. Klin. Chir., 130: 763, 1924.

46. GOMORI, G. & GOLDNER, M.G. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 54: - 287-90, 1943.
47. GORDON, R.S., Jr. 1957, Apud VAUGHAN, M., 1961, op. cit. ref. 104.
48. _____ & CHERKES, A. 1958, Apud VAUGHAN, M., 1961, op. cit. ref. 104.
49. GUIMARÃES, A. Influência da parotidectomia e do Parotin sobre o metabolismo de carboidratos de ratos jovens. Piracicaba, 1976. (Tese (Doutoramento) - Fac. Odontologia - U.E.C.).
50. _____. Effects of salivary gland active principle (Parotin) on glycaemic level and hepatic glycogen content in alloxan-diabetic rats. Archs. oral Biol., 25: 11-3, 1980.
51. _____; TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; VIEIRA, S. Efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de glicogênio hepático. Revta. bras. Pesq. méd. Biol., 12(1): 53-61, 1979.
52. HAGEN, J.H. Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue. J. Biol. Chem., 236: 1023-7, 1961.
53. HALMOS, T. & SOMOGIY, B. Investigations on the correlation between human saliva and carbohydrate metabolism. Nagy

Belor. Arch., 15: 220-5, 1962.

54. HANSEN, M.F.; NIELSEN, J.H. & GLIEMANN, J. The influence of body weight and cell size on lipogenesis and lipolysis of isolated rat fat cells. Europ. J. clin. Invest., 4: 411-8, 1974.
55. HIKI, Y.; AKAZAKI, K.; BAN, T.; MIYAZAKI, J.; TAKIZAWA, N. - Experimental study of salivary glands. Trans. Jap. path. Soc., 22: 273-80, 1932.
56. _____; _____; _____; _____; _____; YOSHIDA, T. Experimental studies on diabetes mellitus. Trans. Jap. - path. Soc., 19: 49-56, 1929.
57. _____; _____; MIYASAKI, Y.; TAKIZAWA, N.; BAN, T.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, S. On the internal secretion of the salivary gland. Tokio Igakukai zasshi, 47: 773-814; 1161-83; 1199-248; 1485-546; 1814-71; 2283-436, 1933. ibid 48: 856-78, 1934.
58. _____; BAN, T.; AKAZAKI, K.; TAKIZAWA, N.; MIYAZAKI, Y. Experimental studies on the salivary gland. Trans. Jap. path. Soc., 20: 130-3, 1930.
59. HONEYMAN, T.W.; LEVY, L.K. & GOODMAN, M. Independent regulation of phosphorylase and lipolysis in adipose tissue. Am. J. Physiol., 237(1): E11, 1979.

60. HOSHINO, K. & LIN, C.D. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the hosts. Anat. Rec., 160: 474-5, 1968.
61. _____; _____. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. Can J. Physiol. Pharmac., 46: 329-34 1969.
62. _____; DECKER, R.F.; MOLNAR, F.; KIM, Y.T. Hypoglycaemic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. Archs. oral Biol., 21: 105-11, 1976.
63. IAMAGAWA, Y. The clinical effects of salivary gland hormone (Parotin and Saliva-Parotin) for the treatment of alveolar pyrrhea. Bull. Tokyo med. Univ., 5: 135-43, 1957.
64. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr. Jap., 1: 1-50, 1954.
65. _____. Parotin: a salivary gland hormone. Ann. N. Y. Acad. Sci., 85: 228-310, 1960.
66. _____; TSURUFUJI, S. Studies on the salivary gland hormone. XXIII- Effect of parotin on serum protein level. J. Pharm. Soc. Japan., 73: 151-5, 1953.
67. _____; TSURUFUJI, S. & KUBOTA, Y. Studies on the salivary gland hormone. XXV. Effect of parotin on the distribution of radioactive ^{32}P in vivo. J. Pharm. Soc. Japan., - 74: 350-7, 1954.

68. JUNGAS, R.J. & BALL, E.G. Studies on the metabolism of adipose tissue. The effects of insulin and epinephrine on free fatty acid and glycerol production in the presence and absence of glucose. Biochemistry, 2: 383-8, 1962.
69. KASS, E.H. & WAISBREN, B.P. A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 60: 303-6, 1945.
70. KONO, Y. Clinic all-round. 1955. Apud BRACCINI, C. & SIERVO, D.R., op. cit. ref. 13.
71. KORN, E.D. Clearing factor. A Heparin-activated lipoprotein lipase isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. J. Biol. Chem., 215: 1-11, 1954.
72. LARKING, P.W. & NYE, E.R. The effect of dietary lipids on lipolysis in rat adipose tissue. Br. J. Nutr., 33: 291-7, 1974.
73. LAZAROW, A. & PALAY, S.L. The production and course of alloxan diabetes in the rat. J. Lab. Clin. Med., 31: 1004-15, 1946.
74. LAWRENCE, A.M.; TAN, S.; HOJVAT, S.; KIRSTEINS, L. Salivary gland hyperglycemic factor: An extrapancreatic source of glucagon-like material. Science, 195: 70-2, 1977.
75. LAVIS, R.V.; WILLIAMS, R.H. & SEATTLE, M.D. Lipolytic effects of high concentrations of insulin on isolated fat

- cells. Enhancement of the response to lipolytic hormones. Diabetes, 22(8): 629-36, 1973.
76. MAUDE, M.D.; ANDERSON, R.E.; ARMSTRONG, K.J. & STOUFFER, J.E. Membrane phospholipides and hormone-sensitive lipolysis in fat cells. Arch. Biochem. and Biophys., 161: 628-31, 1974.
77. MORI, T. The influence of the salivary gland (parotin) on the chick embryo. II. The influence on the general development and on bone of the chick embryo. Showa Igakukai zasshi., 13: 15-23, 1953.
78. NORITA, R. 1955. Apud BRACCINI, C. & SIERVO, D.R. op.cit. ref. 13.
79. OGATA, A.; ITO, Y.; NOZAKI, Y.; OKABE, S.; OGATA, T.; ISHII Z. Chemical and pathological studies on the isolation of salivary hormone. Igakuto - Seibutsugaku, 5: 253-7, 1944.
80. OGATA, T. Ueber die innere sekretion der mundspeschedrusen Trans. 9 th Congr. Far. East. Ass. trop. Med., 2: 709 - 13, 1934. Apud OGATA, T., op. cit. ref. 114.
81. _____. The internal secretion of salivary gland. Endocr. Jap., 2: 247-61, 1955.
82. OKUDA, H.; SAITO, Y.; MATSUOKA, N. & FUJII, S. Mechanism of adrenaline induced lipolysis in adipose tissue. J. Biochem., 75: 131-7, 1974.

83. OKUDAIRA, S. Experimental studies on the effect of the salivary gland hormone (parotin) upon the ossification of nasal septum of rat. Japon J. Otol. Tokio, 58: 216-30 , 1954.
84. OSORIO, J.A. & KRAEMER, A. Stimulative effect of parotin on the body weight of sialoadenectomized rats. Revta bras. Biol., 25(3): 233-6, 1965.
85. PARHOM, C.I.; BABES, A.E.; PETREA, I. Endocrinologie des glandes salivaires. 1957. Apud GLASMAN, F., op. cit. - ref. 39.
86. RENNER, R.; KENMLEZ, W. & HEPP, D. Antagonism of insulin - and lipolytic hormones in the control of adenylate-cyclase activity in fat cells. Eur. J. Biochem., 49: 129-41, 1974.
87. RIZACK, M. Handbook of Physiology Adipose Tissue, American Physiological Society, Washington, D.C., 1965, p.309-14, 1965.
88. RODBELL, M. & JONES, A.B. Metabolism of isolated fat cells. J. Biol. Chem., 241: 140-2, 1966.
89. ROSENFELD, G. Speicheldrüsen Kohlehydratstoffwechsel. Klin Wschr., 12: 711, 1933. Apud BIRNKRANT, W.B., op. cit. ref. 17.
90. ROSENQUIST, U. Inhibition of noradrenaline-induced lipoly

sis in hypothyroid subjects by increased - adrenergic responsiveness. Acta med. scand., 192: 353-9, 1972.

91. RUANGSIRI, C. Changes in islets of Langerhans in living mice after alloxan administration. Anat. Rec., 105: 399-427, 1949.
92. SASAKI, T. Chondrodystrophia foetalis. Acta. paediat.jap. 57: 584, 1953. Apud ITO, Y., op. cit. ref. 64.
93. SASE, T. Antagonistic effect of salivary and thyroid hormone on oxidative phosphorylation. J. Japon Biochem., 30: 173-8, 1958.
94. SEELIG, S. Ueber beziehungen zwischen parotis, pankreas , blutzucker und diabetes mellitus. Klin. Wschr., 7:1228-32, 1928.
95. SOLOMON, S.S. Effect of insulin and lipolytic hormones on cyclic AMP phosphodiesterase activity in normal and diabetic rat adipose tissue. Endocrinology, 96: 1366-73 , 1975.
96. STEINBERG, T. & GWINUP, G. Effect of submaxillary gland extirpation on glucose and insulin tolerance in dogs. Diabetes , 21(6): 722-32, 1972.
97. TAKEDA, T.; YAMASAKI, Y.; YAMABE, H.; SUZUKI, Y.; HAEBARA , H.; IRINO, T.; GROLIMAN, A. Atrophy of the lymphoid tissues of mice induced by extracts of the submaxillary gland.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 126: 212-6, 1967.

98. TAKIZAWA, N. A pathological research on the internal secretion of salivary glands. Acta. path. jap., 4: 129-66, 1954.
99. TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; GUIMARÃES, A. Effects of sialoadenectomy and parotin hormone on the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta. anat., 94: 22-9, 1976.
100. _____. Efeitos do parotin sobre a hiperglicemia, incorporação de glicose e consumo de O₂ pelo epidídimo de ratos normais e diabéticos. Piracicaba, 1979. (Tese (Livre Docência) - Fac. Odontologia - U.E.C.).
101. TOMITA, T. A dynamic role of liver glycogen in alloxan diabetic rats. Endocr. Jap., 20(3): 243-8, 1973.
102. UTIMURA, S. 1927. Apud GLASMAN, F., op. cit. ref. 39.
103. VAUGHAN, M. Effect of hormones on glucose metabolism in adipose tissue. J. Biol. Chem., 236: 2196-9, 1961.
104. _____. The metabolism of adipose tissue "in vitro". J. Lipid Research, 2: 293-316, 1961.
105. _____. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. J. Biol. Chem., 237: 3354-8, 1962.
106. VEGA, F.V. & DE CINGOLANI, G.E.C. Effect of pH on epinephrine induced lipolysis in isolated fat cells. Am. J. Physiol., 227: 168-70, 1974.

106. YAMAGUCHI, T. On the relation of the endocrine functions - and the protein metabolism. Clin. Endocr., 2: 1022-6 , 1954.
107. YUASA, H. Experimental studies on the absorptive function of the striated tubules of the salivary gland. Trans. - Jap. path. Soc., 30: 244-56, 1940; ibid 31: 728-30, 1941.
108. YUASA, K. Experimental studies on the influence of parotin on metabolism. Folia Endocr. Jap., 33: 315-21, 1957.
109. WERTHEIMER, E. & SHAPIRO, B. The physiology of adipose tissue. Physiol. Rev., 28: 451-63, 1948.
110. WINEGRAD, A.I. & RENOLD, A.E. Studies on rat adipose tissue in vitro. J. Biol. Chem., 233(2): 267-76, 1958.
111. WHITE, J.E. & ENGEL, F.L. Lipolytic action of corticotropin on rat adipose tissue in vitro. J. Clin. Invest., 37: 1556-63, 1958.
112. WITTERS, L.A. & TRASKO, C.S. Regulation of hepatic free fatty acid metabolism by glucagon and insulin. Am. J. Physiol., 237(1): E23-E29, 1979.
113. ZIMMERMAN, L.M. Effect of ligation of the parotid ducts on the carbohydrate tolerance of normal dogs. Archs intern. Med., 49: 409-20, 1932.
114. ZINDER, O. & SHAPIRO, B. Effect of cell size in epinephri-

ne and ACTH-induced fatty acid release from isolated fat cells. J. Lipid Res., 12: 91-4, 1971.

115. ZINMON, B. & HOLLENBERG, C.H. Effect of insulin and lipolytic agents on rat adipocyte Low Km Cyclic Adenosine - $3^1:5^1$ monophosphate. Phosphodiesterase. J. Biol. Chem., 249(7): 2182-7, 1974.

CAPÍTULO VIII - RESUMO

8. RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os possíveis efeitos do princípio ativo das glândulas salivares (Parotin) sobre o metabolismo lipídico de ratos normais e diabéticos.

Foram utilizados 48 ratos machos (Rattus norvegicus, albinus, Wistar), com 3 meses de idade, pesando em média 220 gramas. A parte experimental foi desenvolvida em dois modelos:

1. Estudo "In Vitro" - determinação do glicérol;
2. Estudo "In Vivo" - determinação dos ácidos graxos livres.

Para o estudo "In Vitro", foram utilizados 24 animais, distribuídos em 2 Grupos:

Grupo I - Contrôles - 12 animais;

Grupo II - Diabéticos Experimentais - 12 animais.

Tanto para o Grupo I como para o Grupo II foi utilizado o tecido gorduroso da cabeça do epidídimo, incubado em frascos de Warburg para agitação, nos seguintes meios biológicos: TKRF + insulina; TKRF + Parotin; TKRF + Parotin + insulina; TKRF + adrenalina; TKRF + adrenalina + Parotin; TKRF + adrenalina + insulina e TKRF.

Após agitação por 60 minutos, o glicérol liberado pelo tecido adiposo foi dosado pelo método de KORN (1954).

Para o estudo "In Vivo", foram utilizados 24 animais distribuídos em 4 Grupos:

Grupo I - Contrôles - 6 animais;

Grupo II - Diabéticos - 6 animais;

Grupo III- Diabéticos + insulina - 6 animais;

Grupo IV - Diabéticos + Parotin - 6 animais.

Nos animais dos 4 grupos experimentais foram realizadas dosagens de ácidos graxos livres (método de DOLE & MEINERTZ ,1960) e de glicose (método da ortotoluidina) nos intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24 e 32 horas.

Nas condições experimentais utilizadas, verificou-se que o Parotin promoveu diminuição na concentração de glicerol para o meio de incubação e diminuição da lipólise, com menor liberação de ácidos graxos livres para o plasma, da mesma forma que a insulina.

Entretanto, a associação insulina + Parotin, não mostrou ser efetiva na diminuição da liberação de glicérol para o meio de incubação.

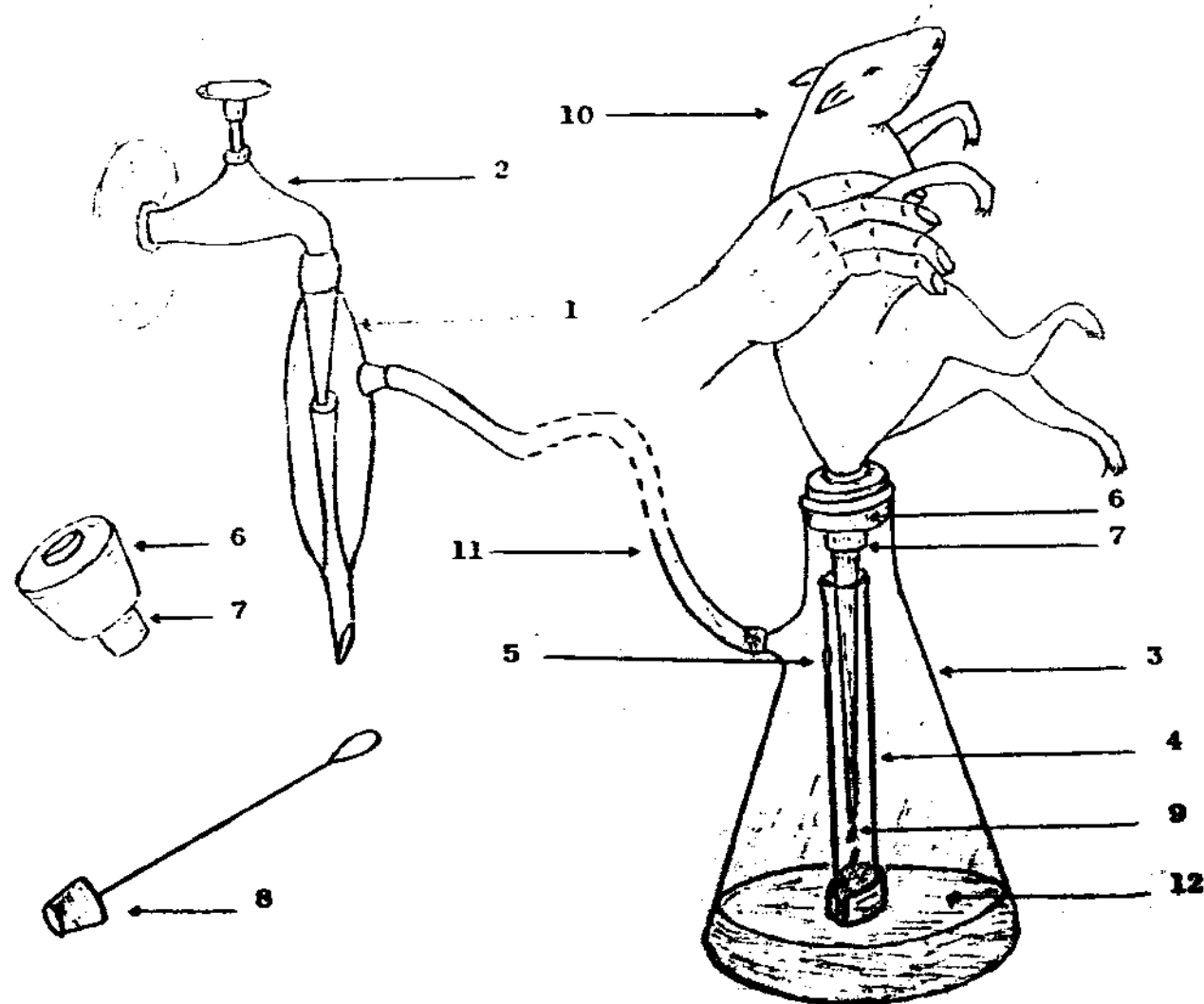
CAPÍTULO IX - APÊNDICE

9. APÊNDICE

Procedimento utilizado para coleta de sangue:

1. Deixar o aparelho (vide desenho anexo) em condições de uso, ou seja, acoplado à torneira d'água com abertura suficiente para proceder à sucção do ar do seu interior;
2. Banhar a parede interna da proveta com um anticoagulante (citrato de sódio a 3,8%, heparina, EDTA, ou outro);
3. Anestesiá-lo o animal (no caso, o rato) por inalação de é-ter etílico ou nembutal;
4. Adaptar a proveta ao aparelho e fixar a rolha de borra-cha com guia;
5. Cortar um pedaço da ponta da cauda do animal e conectá-lo rapidamente ao guia da rolha de tal maneira que impeça, o máximo possível, a entrada de ar no sistema (vide desenho);
6. Com esse procedimento, uma vez que a pressão interna do aparelho torna-se negativa em relação à pressão do ani-mal, o sangue fluirá normalmente. Com esse processo, consegue-se coletar, facilmente, até 3,0 ml de sangue;
7. Amarrar a cauda do animal e/ou colocar algum colutóide e devolvê-lo à gaiola.

COLETOR DE SANGUE



- 1 - Trompa d'água p/ vácuo
- 2 - Torneira d'água
- 3 - Kitassato de 500 ml
- 4 - Proveta 10 ml c) base descartável
- 5 - Orifício para facilitar a saída de ar da proveta
- 6 - Rolha de borracha com guia
- 7 - Guia tubo de vidro introduzido à rolha)
- 8 - Rolha de borracha, pequena c/ haste, dupla função - retirar a proveta com sangue e fechar o sistema após o uso
- 9 - Sangue fluindo da cauda do animal
- 10 - Animal anestesiado (rato)
- 11 - Tubo de borracha - comprimento variável
- 12 - Gesso ou resina acrílica para fixar base descartável da proveta

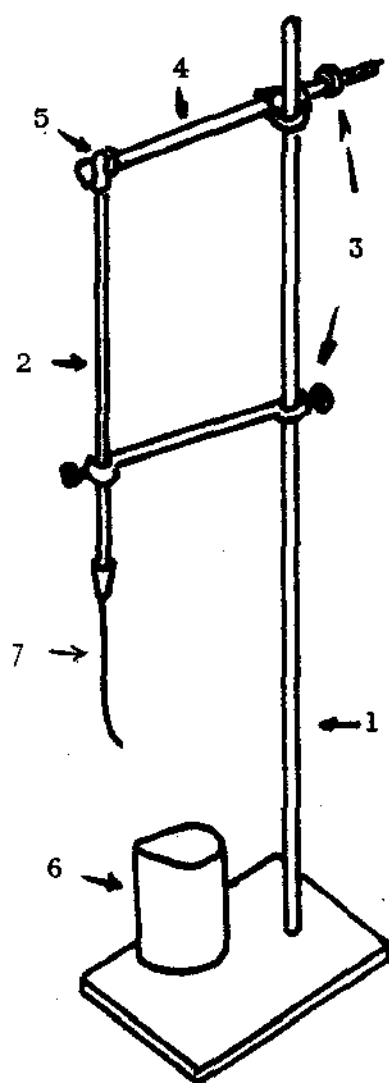
Microburêta Adaptada

Foi utilizada uma microburêta adaptada a um conta-gôtas preso a um suporte de manômetro e apresentando na extremidade inferior, uma agulha 25 x 6. (vide desenho).

Apertando-se a rosca do suporte do manômetro, expulsa-se o ar contido na borracha conta-gôtas e colocando-se a agulha da pipeta dentro da solução a ser utilizada, provoca-se inspiração da mesma soltando-se a rosca do suporte. Isso faz inflar a borracha, enchendo a micropipeta.

Dessa maneira, é possível medir-se com bastante segurança de 1 em 1 microlitro, determinando-se no final do experimento, quantos microlitros foram utilizados.

MICROBURETA ADAPTADA



- 1 - Haste metálica
- 2 - Pipeta microlítrica
- 3 - Presilhas
- 4 - Suporte de manômetro
- 5 - Borracha conta-gotas
- 6 - Becker
- 7 - Agulha descartável